

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

**Produção de ésteres com potencial lubrificante a partir da
esterificação enzimática do óleo fúsel com ácidos graxos de
cadeia longa saturado e insaturado**

Lorena

2020

ROSEMAR DE LIMA

Produção de ésteres com potencial lubrificante a partir da esterificação enzimática do óleo fúsel com ácidos graxos de cadeia longa saturado e insaturado

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração de Desenvolvimento de Produtos e Processos.

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão Original

Lorena

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lima, Rosemar

Produção de ésteres com potencial lubrificante a partir da esterificação enzimática do óleo fúsel com ácidos graxos de cadeia longa saturado e insaturado / Rosemar Lima; orientadora Heizir Ferreira de Castro - Versão Original. - Lorena, 2020. 126 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Biolubrificante. 2. Esterificação. 3. Lipase imobilizada. 4. óleo fúsel. 5. ácido graxo. I. Título. II. de Castro, Heizir Ferreira , orient.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado primeiramente a DEUS, por me capacitar de conhecimentos e habilidades que somente ELE poderia fazer e também por tudo que conquistei até agora. Obrigado, meu Deus, por me dares muito mais do que eu preciso, e por me abençoares muito mais do que eu mereço!

In memoriam de meus pais: Joaquim Soares de Lima e Nadir Francisca da Conceição Lima, não é só pela vida que vocês me deram que eu devo agradecer. É também por me terem inculcado todos os valores que achavam importantes e por me tornarem na pessoa que sou hoje.

Ao futuro do meu filho Kauê Moraes de Lima, quando olhei para os seus olhos e o tive em meus braços pela primeira vez, imediatamente o meu mundo se transformou. De repente senti como se a minha vida já não me pertencesse. Senti a alma cheia de amor e o meu coração fora de mim, que um dia você também seja despertado pelo conhecimento como eu fui.

A Juliana Jobim Dias Carvalho, pelo apoio incondicional e presença constante que foram elementos fundamentais para a conclusão deste trabalho é com você que divido a conquista deste título.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro, primeiramente por acreditar em mim, pela oportunidade concedida de desenvolver este trabalho, pela competência em orientar, pelos seus valiosos ensinamentos, dedicação em todos os momentos, apoio constante durante a realização deste trabalho e por ser um exemplo de profissionalismo e também como pessoa.

A Profa. Dra. Larissa de Freitas e ao Prof. Dr. Francisco Carlos Biaggio pelo apoio na realização de parte deste trabalho, além das valiosas sugestões e contribuições neste trabalho.

Aos Pós-Graduandos e Doutores do Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena: Ana Karine Furtado, Annie Ceron, Carolina Azevedo, Cristiano Reis, Heitor Buzetti, Mateus Casagrande e Savienne Elerbrock, por sempre ter-se colocado à disposição em ajudar, pela amizade e convivência nesse período.

Aos ICs do laboratório: João Pedro e Thiago pela amizade e disposição em ajudar.

Ao Programa de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao ensino público gratuito e de qualidade, por ter me concedido a oportunidade de realizar Graduação e Mestrado.

RESUMO

LIMA, Rosemar. **Produção de ésteres com propriedades lubrificantes a partir da esterificação enzimática do óleo fúsel com ácidos graxos de cadeia longa saturado e insaturado.** 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar ésteres com propriedades lubrificantes a partir do óleo fúsel (matéria-prima residual da destilação do etanol) utilizando lipases como catalisadores por meio da esterificação do óleo fúsel com ácidos graxos de cadeia longa saturado e insaturado. Para tanto, inicialmente foram efetuados testes de seleção de fontes comerciais de lipase com potencial para aplicação nas reações propostas. Seis lipases microbianas com diferentes características bioquímicas (*Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium camemberti* e *Pseudomonas fluorescens*) foram imobilizadas por adsorção física em copolímero de estireno de divinilbenzeno (STY-DVB) e utilizadas como biocatalisadores para mediar a reação de esterificação do álcool isoamílico com os ácidos esteárico ou oleico em meio a solvente, em condições equimolares dos materiais de partida a 45°C sob agitação magnética (150 rpm). Em ambos os sistemas reacionais duas lipases (*Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae*) apresentaram desempenho satisfatório fornecendo elevada conversão molar dos materiais de partida (> 90% em 24 h de reação), sendo selecionadas para testes subsequentes utilizando óleo fúsel como fonte do álcool isoamílico. As condições operacionais de obtenção dos ésteres, estearato de isoamila e oleato de isoamila, empregando o óleo fúsel em substituição ao álcool isoamílico comercial, catalisada por cada biocatalisador foram determinadas por meio de um planejamento experimental composto de face centrada 2², avaliando simultaneamente a influência dos fatores (variáveis independentes) razão molar e temperatura na concentração dos ésteres formados. As condições ótimas estabelecidas em reator de tanque agitado em regime descontínuo foram: razão equimolar e temperatura de 45 °C, para ambos os biocatalisadores independente do sistema reacional. Tais condições maximizam a formação de ésteres (entre 1,40- 1,50 mol L⁻¹) sem ocasionar em elevadas perdas dos materiais de partida (conversão molar > 93%). Entretanto, foi constatada limitada estabilidade mecânica do suporte selecionado para imobilização das lipases, o que provocou fragmentação do derivado imobilizado impossibilitando sua reutilização em bateladas consecutivas. Para eliminar essa desvantagem, foram conduzidos testes em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo. Apesar da viabilidade do sistema, foi constatada limitada estabilidade operacional em função da água liberada na reação que favoreceu a reação inversa. Neste caso, o sistema operacional referente a síntese de estearato de isoamila foi menos suscetível aos efeitos adversos da água formada como subproduto, sendo possível operar o reator por até 10 dias consecutivos sem perda de produtividade. A lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB foi mais eficiente e estável para conduzir a síntese de ambos os ésteres em regime contínuo, fornecendo produtividades da ordem de 3264 e 1655 mmol.g⁻¹.h⁻¹, respectivamente, para estearato de isoamila e oleato de isoamila. As propriedades dos ésteres formados em regime permanente (viscosidade e acidez) foram compatíveis com as características requeridas para uso como lubrificante.

Palavras-chave: biolubrificante. esterificação. lipase imobilizada. óleo fúsel

ABSTRACT

LIMA, Rosemar. **Production of esters with lubricating properties by enzymatic esterification of fusel oil with saturated and unsaturated long chain fatty acids.** 126 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

The present work aimed to synthesize esters from industrial ethanol byproduct, fusel oil, using lipases as catalysts through esterification of fusel oil with long chain fatty acids (C18:0 and C18:1). Initially tests were performed to select commercial sources of lipase with potential for application in the proposed reactions. Six microbial lipases with different biochemical characteristics (*Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium camemberti* and *Pseudomonas fluorescens*) were immobilized by physical adsorption on styrene copolymer of divinylbenzene (STY-DVB) and used as biocatalysts to mediate the esterification reaction of isoamyl alcohol with stearic or oleic acids in solvent medium, under equimolar conditions of the starting materials at 45°C under magnetic agitation (150 rpm). For both reaction systems, two lipases (*Candida antarctica* and *Rhizopus oryzae*) presented satisfactory performance providing high molar conversion of the starting materials (>90% in 24 h of reaction), being selected for subsequent tests using fusel oil as a source of isoamyl alcohol. The operational conditions for obtaining esters, isoamyl stearate and isoamyl oleate, using the fusel oil in place of commercial isoamyl alcohol catalyzed by each biocatalyst were established by means of an experimental plan composed of centered face 2², simultaneously evaluating the influence of the factors (independent variables) molar ratio and temperature in the concentration of the formed esters. The optimum conditions established in a batch stirred tank reactor were: equimolar ratio and temperature of 45 °C, for both biocatalysts independent of the reaction system. Such conditions maximize the formation of esters (between 1.40- 1.50 mol.L⁻¹) without causing high losses of the starting materials (molar conversion > 93%). However, it was observed limited mechanical stability of the selected support for immobilizing the lipases, which caused the breakdown of the immobilized derivative, making impossible to reuse it in consecutive batches. To eliminate this disadvantage, tests were conducted in a packed bed reactor under continuous run. Despite the viability of the system, limited operational stability was also observed as a function of the water released in the reaction that favored the inverse reaction of hydrolysis. In this case, the operating system referring to the synthesis of isoamyl stearate was less susceptible to the adverse effects of the water formed as a by-product, being possible to operate the reactor for up to 10 consecutive days without loss of productivity. The *Candida antarctica* lipase immobilized on STY-DVB was more efficient and stable to conduct synthesis of both esters under continuous runs, providing esters productivities in the order of 3264 and 1655 mmol.g⁻¹.h⁻¹, respectively, for isoamyl stearate and isoamyl oleate. The properties of the formed esters (viscosity and acidity) were compatible with the characteristics required for use as lubricant.

Keywords: biolubricant. esterification. immobilized lipase. fusel oil

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Formação de biolubrificantes por esterificação e transesterificação.....	25
Figura 3.2 - Estruturas dos álcoois primário, secundário e terciário.....	34
Figura 3.3 - Modelos de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas.....	35
Figura 3.4 - Síntese dos ésteres de isoamila por esterificação do óleo fúsel e ácidos graxos correspondentes.....	37
Figura 4.1 - Esquema da reação de esterificação do álcool isoamílico ou óleo fúsel com ácidos esteárico ou oleico.....	43
Figura 4.2 - Esquema experimental das reações em reator de leito fixo operando em regime contínuo. (1) banho termostático, (2) vaso de meio de alimentação, (3) bomba peristáltica, (4) leito catalítico, (5) e (6) linha de recirculação de água de aquecimento, (7) coleta de produto formado	45
Figura 4.3 - Curva de calibração de proteína pelo método de Bradford, utilizando a albumina como padrão.....	48
Figura 5.1 - Perfil de consumo do álcool isoamílico (○) e do ácido esteárico (●) e formação do éster estearato de isoamila (△), durante o progresso da reação de esterificação catalisada pelas lipases: (a) <i>Candida rugosa</i> , (b) <i>Candida antarctica</i> , (c) <i>Rhizopus oryzae</i> , (d) <i>Penicillium camemberti</i> ; (e) <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; (f) <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizadas em STY-DVB	56
Figura 5.2 - Perfil de consumo do álcool isoamílico (○) e do ácido oleico (●) e formação do éster oleato de isoamila (▲), durante o progresso da reação de esterificação catalisada pelas lipases: (a) <i>Candida rugosa</i> , (b) <i>Candida antarctica</i> , (c) <i>Rhizopus oryzae</i> , (d) <i>Penicillium camemberti</i> ; (e) <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; (f) <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizadas em STY-DVB	58
Figura 5.3 - Comparação do desempenho das lipases <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Candida antarctica</i> na formação dos ésteres estearato de isoamila (a) e oleato de isoamila (b).....	60
Figura 5.4 - Formação dos ésteres estearato de isoamila e oleato de isoamila pela atuação das lipases <i>Rhizopus oryzae</i> (a) e <i>Candida antarctica</i> (b)	60
Figuras 5.5(a, b) - Superfície de resposta para os efeitos das variáveis razão molar ácido/álcool e temperatura para formação do estearato de isoamila pela ação da LRO (a) e CALB L (b).....	66
Figura 5.6 - Efeitos das variáveis independentes estudadas, X1 = razão molar e X2 = Temperatura (°C) e suas interações sobre a concentração de oleato de isoamila pela atuação da LRO (a) e CALB L (b) para um nível de confiança de 95% (p < 0,05)	69
Figura 5.7 - Superfície de resposta para os efeitos das variáveis razão molar ácido/álcool e temperatura para formação do oleato de isoamila pela atuação da LRO (a) e CALB L (b)	71
Figura 5.8 - Perfil da formação do estearato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico por lipase <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (tempo espacial= 7,2 h; carga de biocatalisador =3,0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C na presença de solvente).....	72
Figura 5.9 - Perfil da formação do estearato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico por lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (tempo espacial= 5,6 h; carga de biocatalisador =3,0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C na presença de solvente).....	73
Figura 5.10 - Perfil da formação do oleato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico pela LRO imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (reação controle, tempo espacial= 7,2 h; carga de biocatalisador =3.0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C na presença de solvente).....	75

Figura 5.11 - Perfil da formação do oleato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico pela CALB L imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (tempo espacial= 6,8 h; carga de biocatalisador =3.0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C na presença de solvente)	76
Figuras 5.12 - Espectro de FT-IR da amostra de óleo fúsel.....	77
Figuras 5.13 - Espectro de FT-IR da amostra do éster estearato de isoamila	78
Figuras 5.14 - Espectro de FT-IR da amostra do éster oleato de isoamila.....	78
Figura 5.15(a,b) - Espectros de RMN ¹³ C e RMN ¹ H da amostra de estearato de isoamila.	79
Figura 5.16(a,b) - Espectros de RMN ¹³ C e RMN ¹ H da amostra de oleato de isoamila.....	80

LISTA DE QUADROS

- Quadro 3.1** - Caracterização de biolubrificantes a base de óleos vegetais com relação aos lubrificantes comerciais..... **24**
- Quadro 3.2** - Processos descritos na literatura por vários autores referentes a esterificação do álcool isoamílico proveniente do óleo fúsel com diferentes ácidos graxos sob atuação de lipases de diferentes fontes..... **39**
- Quadro 4.1** - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação dos ésteres estearato de isoamila e oleato de isoamila e do álcool isoamílico..... **49**

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Teores médios de álcoois, ésteres e aldeídos em amostras de óleo fúsel. Concentração média (g.L^{-1}) de três séries de amostras para cada usina.....	38
Tabela 4.1 - Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para o suporte Diaion HP-20	41
Tabela 4.2 - Valores reais e codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial 2^2 com face centrada.	44
Tabela 5.1 - Propriedades das lipases testadas na forma livre	53
Tabela 5.2 - Atividade hidrolítica, recuperada e sintética das lipases imobilizadas em STY-DVB	54
Tabela 5.3 - Esterificação do álcool isoamílico com ácido esteárico catalisada por diferentes fontes de lipase imobilizadas em STY-DVB	57
Tabela 5.4 - Esterificação do álcool isoamílico com ácido oleico catalisada por diferentes fontes de lipases imobilizadas em STY-DVB	59
Tabela 5.5 - Influência dos materiais de partida na composição dos meios reacionais usados nas reações de esterificação.....	61
Tabela 5.6 - Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento composto de face centrada 2^2 utilizado para otimizar a reação de esterificação do óleo fusel com ácido esteárico catalisada pelas lipases de <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Candida antarctica</i> imobilizadas em STY-DVB	63
Tabela 5.7 - Estimativa dos efeitos para a formação de estearato de isoamila pela atuação da LRO de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada para um nível de confiança 95%.	64
Tabela 5.8 - Estimativa dos efeitos para a formação de estearato de isoamila pela atuação da CALB L de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada para um nível de confiança 95%. .	64
Tabela 5.9 - Modelos matemáticos para a variável concentração de estearato de isoamila (Y) em função da razão molar (X_1) e Temperatura (X_2).	65
Tabela 5.10 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de éster pela atuação da LRO	65
Tabela 5.11 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de éster pela atuação da CALB L.....	66
Tabela 5.12 - Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento composto de face centrada 2^2 utilizado para otimizar a reação de esterificação do óleo fusel com ácido oleico catalisada pelas lipases de <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Candida antarctica</i> imobilizadas em STY-DVB	68
Tabela 5.13 - Modelos matemáticos para a variável concentração de oleato de isoamila (Y) em função da razão molar (X_1) e Temperatura (X_2).	70
Tabela 5.14 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de oleato de isoamila pela atuação da LRO	71
Tabela 5.15 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de oleato de isoamila pela atuação da CALB L.....	71

Tabela 5.16 - Comparação do desempenho das diferentes lipases imobilizada em STY-DVB na esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico conduzida em reator de leito fixo em fluxo contínuo, na presença de iso-octano em 45 °C.	74
Tabela 5.17 - Comparação do desempenho das diferentes lipases imobilizada em STY-DVB na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico conduzida em reator de leito fixo em fluxo contínuo, na presença de iso-octano em 45 °C.	76
Tabela 5.18 - Propriedades dos ésteres purificados	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Biolubrificantes	22
3.2 Processos para obtenção dos biolubrificantes	25
3.3 Lipases	26
3.4 Síntese de bioésteres catalisadas por lipases	29
3.5 Fatores que interferem nas biotransformações com lipases	30
3.5.1 Influência da polaridade dos solventes	30
3.5.2 Efeitos da água	30
3.5.3 Influência do uso de lipases imobilizadas	32
3.5.4 Efeitos do álcool.....	33
3.6 Biorreatores usados na produção de ésteres	34
3.7 Produtos alvo do projeto	36
3.8 Utilização do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres lubrificantes.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Lipases	41
4.2 Suporte de imobilização.....	41
4.3 Reagentes	41
4.4 Outros reagentes.....	42
4.5 Equipamentos.....	42
4.6 Metodologia experimental	42
4.6.1 Tratamento do óleo fúsel.....	42
4.6.2 Imobilização das lipases no suporte polimérico.....	42
4.6.3 Síntese dos ésteres em regime descontínuo.....	43
4.6.4 Delineamento experimental	43
4.7 Síntese de ésteres em regime contínuo.....	44
4.8 Purificação dos ésteres de isoamila.....	45
4.9 Métodos de análise.....	45
4.9.1 Teor de umidade das enzimas imobilizadas	45
4.9.2 Teor de água nas amostras da fase líquida do sistema reacional.....	46
4.9.3. Determinação da atividade hidrolítica das lipases	46
4.9.3.1 Método de hidrólise do azeite de oliva.....	46
4.9.3.2 Método de hidrólise do butirato de metila	46
4.9.4 Determinação da atividade de esterificação	47
4.9.5 Determinação do teor de proteínas totais	47
4.9.6 Determinação da concentração de ácidos graxos	48
4.9.7 Determinação dos produtos formados e álcool consumido.....	49
4.9.8 Propriedades dos ésteres purificados	49
4.10 Tratamento dos dados	50
4.10.1 Rendimento de imobilização das lipases em STY-DVB.....	50
4.10.2 Ensaio de esterificação	50
4.10.3 Tempo espacial (τ)	51
4.10.4 Produtividade	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Propriedades das preparações enzimáticas.....	53
5.2 Seleção da fonte de lipase para síntese do estearato de isoamila	54
5.3 Seleção da fonte de lipase para síntese do oleato de isoamila.....	57

5.4 Desempenho comparativo das fontes de lipases selecionadas para mediar a síntese do estearato e oleato de isoamila.....	59
5.5 Planejamento fatorial para determinar as condições otimizadas da síntese do esterato de isoamila catalisada pelas lipases <i>R.oryzae</i> e <i>C. antarctica</i>	62
5.5.1 Análise estatística dos resultados considerando a concentração de estearato de isoamila como variável dependente.....	64
5.6 Planejamento fatorial para determinar as condições otimizadas da síntese do oleato de isoamila pela atuação das lipases <i>R. oryzae</i> e <i>C.antarctica</i>	66
5.6.1 Análise estatística dos resultados considerando a concentração do oleato de isoamila formado pela atuação das lipases <i>R. oryzae</i> e <i>C.antarctica</i> como variável dependente	69
5.7 Síntese de estearato de isoamila catalisada pelas lipases <i>R.oryzae</i> e <i>C.antarctica</i> conduzida em reator de leito fixo em regime contínuo	71
5.8 Síntese de oleato de isoamila catalisada pelas lipases <i>R.oryzae</i> e <i>C.antarctica</i> imobilizada em STY-DVB conduzida em reator de leito fixo em regime contínuo.....	74
5.9 Propriedades dos ésteres obtidos.....	77
6 CONCLUSÕES	81
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES.....	90

1 INTRODUÇÃO

O termo biolubrificante aplica-se a todos os lubrificantes que são facilmente biodegradáveis e não tóxicos para os seres humanos e o meio ambiente. O uso de biolubrificante ainda é muito limitado quando comparado ao de óleo mineral, embora essa tendência esteja aumentando e dependa do investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D). O aumento da demanda por lubrificantes biodegradáveis está relacionado à evolução das regulamentações ambientais, com regras mais restritivas sendo implementadas para minimizar o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado (SILVA; FREIRE, 2016; SINGH; SHARMA; SINGLA, 2019).

Ésteres com propriedades biolubrificantes podem ser sintetizados por transesterificação de óleos vegetais ou a partir de reação de esterificação de ácidos graxos de cadeia longa com álcoois de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) (DORMO *et al.*, 2004; SALIMON *et al.*, 2014), utilizando catalisadores químicos ou bioquímicos. Entretanto, a síntese de ésteres conduzida por via química apresenta desvantagens associadas ao custo energético, como o uso de condições operacionais elevadas de temperatura e pressão (KÜÇÜK; CEYLAN, 1998). Além disso, catalisadores químicos possuem baixa especificidade, fornecendo geralmente produtos de composição química mista ou contaminada, o que requer etapas posteriores de purificação (STERGIOU *et al.*, 2013).

Desta forma, a síntese enzimática, tem se mostrado uma alternativa importante para a substituição gradativa dos processos químicos tradicionais por oferecer vantagens necessárias ao estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo (CHOI *et al.*, 2015; ANOBOM *et al.*, 2014), sendo cada vez mais crescente o interesse da aplicação de catalisadores bioquímicos em síntese orgânica (BIROLLI *et al.*, 2015). Entre esses, especial atenção tem sido dedicada à enzima lipase (glicerol éster hidrolases – EC 3.1.1.3), em função de sua versatilidade são capazes de hidrolisar triacilgliceróis e sintetizar ésteres via esterificação (STERGIOU *et al.*, 2013; CHOI; HAN; KIM, 2015). Como biocatalisadores, as lipases têm sido frequentemente aplicadas na produção de ácidos graxos por meio da hidrólise de óleos e gorduras, lipídios modificados e ésteres com diferentes propriedades, entre outras aplicações (ANOBOM *et al.*, 2014; KHAN; RATHOD, 2015; SALIMON *et al.*, 2014; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

A síntese de ésteres catalisada por lipases já foi descrita na literatura para compostos de diferentes propriedades como aromas, emulsificantes e biolubrificantes (DHAKE; THAKARE; BHANAGE, 2013; KHAN; RATHOD, 2015; VILAS BÔAS *et al.*; 2018), e

em princípio, a reação pode ser conduzida a partir de um álcool com ácido carboxílico em presença ou ausência de solventes, resultando em produtividades elevadas e rendimentos quantitativos (STERGIOU *et al.*, 2013). Entretanto, os trabalhos reportados na literatura referentes a aplicação das lipases na esterificação direta de álcoois secundários com ácidos de cadeia longa ainda são escassos (VILAS BÔAS *et al.*, 2017; DE CASTRO *et al.*, 1999), tendo em vista que a esterificação de álcoois secundários é fortemente dependente da especificidade da lipase e do tamanho da cadeia do ácido carboxílico (DE CASTRO; MORIYA; RIBEIRO, 2000). Os rendimentos de esterificação tendem a diminuir com ácidos carboxílicos de cadeia curta; sendo os resultados mais baixos obtidos com o ácido acético (WELSH; MURRAY; WILLIAMS, 1989; KIRDI *et al.*, 2017). Neste contexto, a fonte de lipase e a polaridade do doador do grupo acila são fatores críticos que devem considerados no estabelecimento das condições adequadas para se alcançar uma eficiente transformação do substrato em produto por catálise enzimática.

Em trabalhos anteriores desenvolvidos na Escola de Engenharia de Lorena (VILAS BÔAS *et al.*, 2017; VILAS BÔAS *et al.*, 2018) utilizando óleo fúsel como fonte de álcool secundário e ácidos graxos de cadeia média (caprílico e láurico) foi possível produzir com sucesso ésteres com propriedades aromáticas e emulsificantes em sistemas operando em regime descontínuo e contínuo. Entretanto, com relação a ácidos graxos de cadeia longa e insaturado (ácido oleico) foi constatado limitado desempenho do sistema operacional na síntese do oleato de isoamila, provavelmente devido baixa atividade sintética do biocatalisador selecionado para ácidos graxos de cadeia longa insaturados (VILAS BÔAS, 2018).

O presente trabalho deu continuidade aos estudos anteriormente realizados por Vilas Bôas (2018) no que se refere à síntese enzimática de ésteres de cadeia longa com propriedades lubrificantes, adotando as recomendações de estudos posteriores, tais como substituir o ácido oleico por ácido esteárico e testar outras fontes de lipase microbiana que não apresentam atividade limitada para ácidos carboxílicos insaturados.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar ésteres com propriedades lubrificantes pela rota enzimática a partir da esterificação do óleo fúsel com os ácidos esteárico e oleico em processos conduzidos em regime descontínuo e contínuo. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo global do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas, que podem ser visualizadas como objetivos específicos:

- ✓ Seleção da fonte de lipase para catalisar a reação de esterificação do álcool isoamílico comercial com os ácidos esteárico e oleico;
- ✓ Estabelecimento das condições reacionais da síntese de estearato e oleato de isoamila utilizando óleo fúsel como fonte do álcool isoamílico e as fontes de lipases selecionadas adotando a ferramenta de planejamento fatorial
- ✓ Síntese dos ésteres nas condições estabelecidas em regime descontínuo e contínuo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliografia serão tratados os principais temas relacionados com trabalho experimental desenvolvido enfocando conceitos de biolubrificantes, matérias-primas e processos, dando ênfase a reação de interesse, esterificação enzimática.

3.1 Biolubrificantes

O termo "biolubrificante" é atribuído a lubrificantes provenientes de matérias-primas de fontes renováveis, como: óleos vegetais, gorduras animais ou outras fontes biodegradáveis de hidrocarbonetos e possui a capacidade comprovada de ser decomposto, por ação microbiana, em um determinado intervalo de tempo. Em termos gerais, biodegradabilidade significa a tendência de um lubrificante ser metabolizado por microrganismos em até um ano (KANIA *et al.*, 2015). Quando a degradação é completa, significa que o lubrificante retornou essencialmente à natureza, e quando é dita parcial, indica que um ou mais componentes do lubrificante não são degradáveis (KANIA *et al.*, 2015).

O mercado de lubrificantes acabados ainda tem muito espaço para crescimento, particularmente em nichos de mercado, como os biolubrificantes. Esse nicho possui, atualmente, aproximadamente 1% do mercado total de lubrificantes acabados e é conduzido por regras governamentais. Espera-se que este mercado aumente numa taxa de crescimento anual (CAGR) de 5%, nos próximos cinco anos (PORTAL LUBES, 2017).

Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas para ampliar o uso de óleos vegetais como biolubrificantes. Por exemplo, óleo de cozinha residual foi identificado como potencial matéria-prima potencial um produto que poderia ser refinado e alterado para convertê-lo em vários biolubrificantes para o setor automotivo. Além disso, tem sido geralmente aceito pelos pesquisadores que por volta de 2030, 15% de todos os lubrificantes utilizados serão biodegradáveis (EDITORA STILO, 2017).

A demanda por lubrificantes biodegradáveis está relacionada a conscientização crescente quanto ao impacto das tecnologias convencionais sobre o meio ambiente. Essa conscientização está ocorrendo tanto como resultado da combinação de regulações locais e nacionais quanto pela influência dos consumidores. Países europeus, especificamente Alemanha, Áustria e os países da Escandinávia, têm conduzido grandes esforços nessa área. Há um grande empenho na Europa no sentido de se explorar materiais de origem agrícola. A Rede Interativa para Culturas Agrícolas e Aplicações (Interactive European Network for

Industrial Crops and their Applications – IENICA) é composta por 14 países com o objetivo de criar sinergia com a indústria de culturas agroindustriais da União Europeia, desenvolvendo oportunidades científicas, industriais e de mercado para aplicações dessas culturas (HONARY, 2009).

A maior parte dos fluidos hidráulicos de origem vegetal, é prontamente biodegradada. Os óleos vegetais são tipicamente 99% biodegradáveis, reduzindo, usualmente, para 90% a 98% após adição de aditivos. Por outro lado, a biodegradabilidade dos óleos minerais é de apenas 20% (SILVA; FREIRE, 2016). Entretanto, o uso extensivo de óleos vegetais é restrito devido ao seu desempenho ineficiente a baixas temperaturas e baixas estabilidades hidrolítica e termo-oxidativa, as quais podem ser mitigadas por meio de modificações na estrutura do óleo (GOYAN *et al.*, 1998).

Óleos básicos sintéticos oferecem melhores características de estabilidade e desempenho do que óleos minerais. A maioria dos óleos sintéticos biodegradáveis são ésteres que oferecem estabilidades térmica e oxidativa superiores. Apesar do custo dos lubrificantes com base em óleos vegetais ser maior do que os de base mineral, vantagens ambientais em curto, médio e longo prazos podem balancear essa diferença. Além disso, a opção de utilização de biolubrificantes pode contribuir para melhorar a imagem pública das companhias (ISO 14000), e, assim, abrir a possibilidade de conquista de novos mercados (RUDNICK; SHUBKIN, 1999).

As principais propriedades dos biolubrificantes são: estabilidade térmica e oxidativa, viscosidade, índice de viscosidade, comportamento a baixas temperaturas que são dependentes da estrutura da molécula e a composição em triacilgliceróis. Apesar de seus muitos atributos favoráveis, a maior desvantagem é a sua baixa estabilidade térmico-oxidativa, solidificação a baixas temperaturas (altos pontos de fluidez), deterioração biológica e instabilidade hidrolítica. Adicionalmente, muitos biolubrificantes, particularmente os ésteres são susceptíveis a rápida degradação oxidativa devido à presença de ácidos graxos livres e duplas ligações na cadeia de carbono (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017).

De uma forma geral, as principais funções que um biolubrificante precisa atender, são: a) reduzir as perdas de energia mecânica, b) reduzir o desgaste dos componentes, (c) proteger da corrosão, d) diminuir a temperatura de funcionamento das máquinas e f) evitar que detritos e sujeiras entupam os depósitos.

Considerando tais requisitos, vários estudos estão sendo desenvolvidos visando melhorar as propriedades físico-químicas dos biolubrificantes. Os resultados dessas

investigações têm demonstrado que os biolubrificantes podem ser substitutos eficientes e de baixo custo para óleos derivados do petróleo. O resumo de alguns trabalhos reportados na literatura é mostrado no Quadro 3.1, destacando às características dos biolubrificantes a base de óleos vegetais.

Quadro 3.1 - Caracterização de biolubrificantes a base de óleos vegetais com relação aos lubrificantes comerciais

Biolubrificantes	Lubrificante referência	Características
Óleo de coco	SAE 20W50	Menor coeficiente de fricção, boas propriedades antidesgaste, melhores propriedades lubrificantes
Óleo de palma	SAE 20W50	Menor corrosividade, menor coeficiente de fricção, boas propriedades oxidativas e anticorrosivas, forte estabilidade da película lubrificante.
Óleo de palma residual	SAE 40	Baixo coeficiente de fricção, alta viscosidade.
Óleos de jatropha, soja, oliva, coco, mamona, girassol.	Óleos minerais derivados do petróleo	Alto ponto de fulgor, alto índice de viscosidade, alta lubricidade, menores perdas por evaporação e melhor desempenho, menor custo e ecologicamente amigável
Óleo de mamona	Óleo mineral super refinado	Bom índice de viscosidade, baixa tendência em formar depósitos, baixa volatilidade, altas concentrações de antioxidantes
Óleo de soja	Óleos minerais Derivados do petróleo	Menor coeficiente de fricção, melhores propriedades lubrificantes, não tóxico, barato e ecologicamente amigável
Óleo de colza quimicamente modificado	SAE20W40	Boa estabilidade oxidativa, melhoria das propriedades de fluxo a frio, melhor desempenho em termos de fricção.

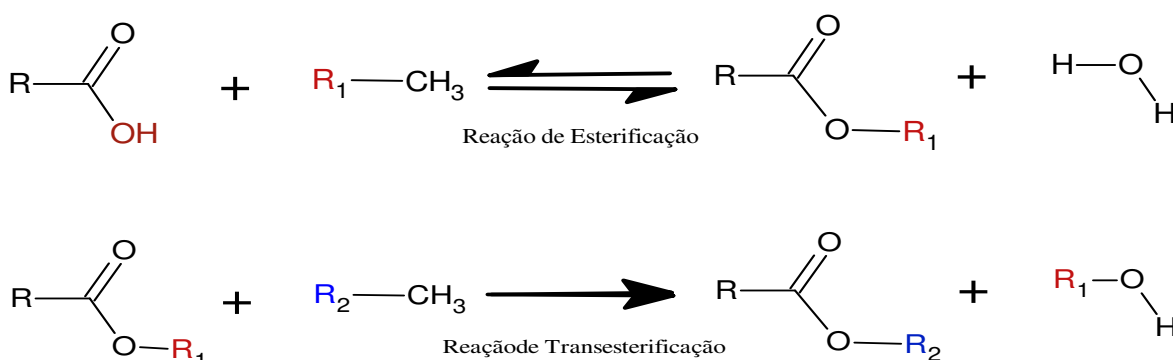
Fonte: MOBARAK *et al.*, 2014.

3.2 Processos para obtenção dos biolubrificantes

A obtenção de biolubrificantes pode ser efetuada por transesterificação de triacilgliceróis com álcoois ou por esterificação direta de ácidos carboxílicos com álcoois (Esquema 3.1). Na transesterificação são formados uma mistura de ésteres de alquila derivados do aceptor do grupo acila usado, com liberação do glicerol com subproduto. A composição dos ésteres está associada com as diferentes cadeias de ácidos graxos que compõe a estrutura do triacilglicerol. Cabe destacar que a estabilidade oxidativa do biolubrificante depende do grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo que a presença de insaturações na molécula de triacilglicerol (ácidos oleico, linoleico e linolênico), funciona como sítios ativos para várias reações de oxidação. Ácidos graxos saturados têm estabilidade oxidativa relativamente mais elevada (RUDNICK, 2006).

A esterificação consiste na reação entre o álcool e o ácido graxo formando éster e água. Essa reação é reversível e atinge o equilíbrio quando existe excesso de reagentes, a reação inversa é a hidrólise. Assim como a reação de transesterificação, a esterificação ocorre mais rapidamente quando são utilizados álcoois de baixa massa molecular, uma vez que a presença de grupos volumosos reduz a velocidade de reação (MORRISON, 1990).

Figura 3.1 - Formação de biolubrificantes por esterificação e transesterificação



Fonte: Adaptado de KHAN; RATHOD, 2015.

Uma produção viável economicamente de biolubrificantes em escala industrial deve atender, no mínimo, aos seguintes critérios: bom rendimento, balanço energético favorável, pequeno impacto no meio ambiente e simplicidade. Para tanto torna-se necessário a escolha do catalisador adequado para a produção de ésteres por meio de reações de esterificação ou transesterificação.

Os catalisadores podem ser classificados entre homogêneos e heterogêneos e podem ter caráter alcalino, ácido ou bioquímico. Entre os homogêneos alcalinos os mais utilizados são hidróxidos e alcóxidos de metais. O metóxido de sódio é mais efetivo que o KOH e o NaOH, mas tem alto custo (AALAM; SARAVANAN, 2015). Entretanto, os catalisadores homogêneos básicos são extremamente sensíveis à presença de ácidos graxos livres e água.

Os catalisadores ácidos heterogêneos têm potencial como alternativa aos catalisadores ácidos homogêneos. Algumas das vantagens deste tipo de catálise são a possibilidade de usar óleos com altos teores de ácidos graxos livres, realizar simultaneamente esterificação e transesterificação, eliminar a lavagem dos ésteres, recuperação e reutilização do catalisador e a redução dos problemas de corrosão (LOURINHO; BRITO, 2015). As vantagens da rota química são a possibilidade de obter elevadas taxas de conversão em períodos curtos de reação, baixo custo de catalisador e condições de reação moderadas (LEUNG; YAU, 2017). Na literatura podem ser encontrados vários estudos referentes a produção de biolubrificantes derivados de óleos vegetais usando catalisadores químicos (MCNUTT; HE, 2015), entretanto a busca de novas abordagens de catalisadores, não se limita às rotas catalíticas químicas convencionais. Recentemente, os catalisadores bioquímicos vêm ganhando espaço para potencialmente serem capazes de superar os catalisadores químicos em vários segmentos industriais, incluindo o setor energético (LOURINHO; BRITO, 2015).

Devido às suas excelentes propriedades funcionais (atividade, seletividade e especificidade), os catalisadores bioquímicos (enzimas) são capazes de catalisar processos mais complexos sob condições ambientais e experimentais amenas. Como alternativa ao processo convencional e com o objetivo de atender às legislações nacionais de controle ambiental, é interessante substituir a rota química por rota enzimática na síntese de ésteres graxos (WATANABE *et al.*, 2007 a, b). Os catalisadores bioquímicos usados nas reações de transesterificação e esterificação pertencem a classe das hidrolases, especificamente lipases. As vantagens das lipases comparadas com os catalisadores químicos (ácidos e bases) são múltiplas, como o menor requerimento energético, alta seletividade, condições moderadas de operação, menor formação de subprodutos e ausência da formação de sabão (MEUNIER; KARIMINIA; LEGGE, 2017).

3.3 Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) têm como principal função “in vivo” catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono)

na interface lipídio/água, produzindo os ácidos graxos correspondentes. Apesar dos triacilgliceróis serem seu substrato natural as lipases também são capazes de utilizar outros tipos de substratos e catalisar outros tipos de reações, dependendo do meio reacional utilizado (aquoso ou orgânico). Assim, na presença de um nucleófilo que pode competir com a água, é possível conduzir um número significativo de reações úteis em biocatálise, como esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise, com alta especificidade, estabilidade e sob condições brandas (VILLA LOBOS, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2019).

As lipases atuam na interface gerada por um substrato lipídico hidrofóbico em meio aquoso (RODRIGUES *et al.*, 2019). Essa propriedade característica das lipases é denominada de ativação interfacial, significando um aumento acentuado na atividade da lipase observada quando o substrato começa a formar uma emulsão, apresentando assim à enzima uma área interfacial (KAPOOR; GUPTA, 2012). Devido ao comportamento das lipases do tipo encaixe induzido, elas podem converter um número significativo de substratos artificiais, que naturalmente não têm as estruturas dos triacilgliceróis (FABER, 2011).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas; porém, os microrganismos são a fonte preferida, uma vez que são produzidas com altos rendimentos e produtividades, possuem grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva. Inicialmente, as lipases microbianas eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com o de outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os avanços registrados na área da biologia molecular têm permitido aos fabricantes de enzimas colocarem no mercado lipases microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível (FABER, 2011). Lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras (DE CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade (KAPOOR; GUPTA, 2012). As lipases não específicas clivam as moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol e monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química com exceção do produto de menor grau de termodegradação devido à temperatura na biocatálise ser bem menor. Lipases (1,3-específica) catalisam os ácidos graxos na posição

1 e 3 do glicerol. Com lipase de ácidos graxos específicas, somente um tipo particular de ácidos graxos é formado a partir de moléculas de acilglicerol (KAPOOR; GUPTA, 2012).

Lipases também catalisam a separação enantiosseletiva de compostos quirais e apresentam uma versatilidade para catalisar reações de esterificação (hidrólise), transesterificação e interesterificação (RODRIGUES *et al.*, 2019). Esta habilidade catalítica tem sido aplicada nas modificações de óleos e gorduras, síntese de compostos orgânicos, suplementos de detergentes e procedimentos analíticos. As atividades hidrolíticas das lipases podem ser diretamente relacionadas com suas atividades de síntese, mas são independentes de suas atividades de interesterificação. Apesar de lipases de fontes distintas serem capazes de catalisar a mesma reação, os desempenhos de cada uma delas, sob as mesmas condições de reação, podem ser diferentes (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

As lipases em sua maioria são estáveis em solução aquosa neutras à temperatura ambiente, apresenta faixa de atividade e estabilidade ampla de pH 5 a 9, com faixa ótima situada entre pH 6 a 8 e faixa de temperatura ótima entre 30 e 40 °C. No entanto, a sua termoestabilidade pode variar consideravelmente em função de sua origem, sendo que entre as diversas fontes de lipases a que possui maior estabilidade térmica é a microbiana (DE CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases podem ser utilizadas na sua forma livre, imobilizada ou como células íntegras. Nos dois primeiros casos, as enzimas são produzidas por cultivo submerso, recuperada e purificada antes da utilização. Diferentes microrganismos como *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*, entre muitos outros, são usados para produção de lipases (KIRAN *et al.*, 2016). Atualmente, existe um interesse crescente no uso de lipases imobilizadas em função desses biocatalisadores permitirem sua fácil separação do produto obtido, facilitarem sua posterior reutilização e reduzirem gastos com o processo de purificação. Adicionalmente, a imobilização protege a enzima de componentes inibidores eventualmente presentes no substrato e geralmente aumenta a estabilidade térmica da enzima (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Uma série de técnicas tem sido descritas para a imobilização de lipases. Estes métodos podem ser categorizados, conforme com o tipo de ligação entre o suporte e a enzima em adsorção, ligação covalente, ligação cruzada e encapsulação em diferentes matrizes (MEUNIER; KARIMINIA; LEGGE, 2017).

Desse modo, grande variedade de materiais naturais e sintéticos com diferentes características de tamanho, forma, porosidade, hidrofobicidade e densidade tem sido testados

para a imobilização de lipases (CIPOLATTI *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Os suportes mais recomendados para a imobilização das lipases para seu subsequente uso como biocatalisadores em reações em meio orgânico são os copolímeros hidrofóbicos microporosos de estireno de divinilbenzeno (STY-DVB), polipropileno, Sepharose, sílica funcionalizada com organosilanos entre outros (RODRIGUES *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019).

3.4 Síntese de bioésteres catalisadas por lipases

A versatilidade da lipase como catalisador para obtenção de ésteres é evidente pelo número de processos implementados industrialmente (DAIHA *et al.*, 2015). Por exemplo, a esterificação por lipase foi comercializada em meados da década de 90 pela Unichema International para produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza, como o isopropilmiristato (miristato de isopropila), isopropilpalmitato (palmitato de isopropila) e 2-etilhexilpalmitato (palmitato de 2-etilhexila), que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subsequentes (NOVO NORDISK, 1995).

Os ésteres de glicerol apresentam também, relevantes propriedades como agentes emulsificantes e, dependendo de sua composição podem fazer parte de sistemas emulsificantes para uso em cremes, molhos e loções (FREITAS *et al.*, 2011). Outra aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres aromatizantes, principalmente para o uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. O mercado mundial para esses compostos está avaliado em US\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor do mercado de aditivos alimentares (KHAN; RATHOD, 2015). Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor (DAIHA *et al.*, 2015).

Na síntese de ésteres catalisada por lipases, diversos parâmetros, como por exemplo, teor de água do meio reacional, hidratação da enzima, temperatura, concentração do substrato, polaridade do solvente, tamanho da cadeia e estrutura química dos materiais de partida, podem afetar o desempenho da síntese (STERGIOU *et al.*, 2013).

3.5 Fatores que interferem nas biotransformações com lipases

3.5.1 Influência da polaridade dos solventes

A seleção do solvente orgânico é um fator importante na catálise enzimática, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima. Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da camada proteica, levando à perda da atividade enzimática. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos requerem substancialmente menor quantidade de água para obtenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (ZAKS; KLIBANOV, 1988).

Os solventes mais utilizados nas reações catalisadas por lipases são: n-hexano, heptano, ciclohexano, octano e outros. As velocidades das reações enzimáticas são afetadas drasticamente pela polaridade do substrato. Portanto, a polaridade do solvente (afinidade do solvente pela água) se apresenta como um dos critérios mais importantes para uma condução eficiente de uma reação enzimática em meio orgânico. Nesse sentido, logaritmo do coeficiente de partição de um composto entre n-octanol e água ($\log P$), tem sido largamente empregado para prever o rendimento de uma reação, em presença de um determinado solvente. Conforme modelo proposto por Laane et al. (1987), a reação se processa em maior extensão na presença de solventes mais hidrofóbicos ($\log P > 3,0$) e em menor extensão em presença de solvente hidrofílicos ($\log P < 2,0$). Entretanto, para garantir um adequado grau de biocompatibilidade do solvente com o catalisador, utilizam-se critérios adicionais, tais como: densidade, viscosidade, toxicidade, ponto de ebulição e a natureza química do solvente (AIRES-BARROS, 2002).

3.5.2 Efeitos da água

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter seu estado conformacional tridimensional ativo mesmo quando fixadas em suportes. A água contribui para a integridade estrutural, a polaridade do centro ativo e a estabilidade proteica. Isto fornece interações hidrofóbicas dos resíduos polares com a molécula da enzima, a qual poderia de outra maneira interagir uma com a outra, criando uma conformação estrutural incorreta. A água pode também limitar a solubilidade dos substratos hidrofóbicos ao redor da enzima. A quantidade de água necessária varia significativamente dependendo da origem

da lipase. Alguns pesquisadores sugerem uma monocamada de água ao redor da molécula da enzima enquanto outros propõem quantidades mínimas embebidas na molécula da enzima (ZAKS *et al.*, 1988; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

Quando a lipase é usada nas reações de esterificação, é necessário um rígido controle do teor de água no meio reacional e um compromisso entre a insolubilidade dos substratos em solventes apolares e o grau de desnaturação da enzima. Os mecanismos que envolvem o controle destes parâmetros são extremamente complexos, principalmente com relação ao teor de água presente no meio reacional, que pode ter origem a partir de diversas fontes (HALLING, 1990): i) água oriunda do substrato e solvente (se presente); ii) água presente na enzima; iii) água no suporte de imobilização (se presente) e iv) água formada durante a reação.

Por esta razão, um controle do teor de água no meio reacional deve ser efetuado, por meio de uma seleção adequada dos parâmetros de reação. Uma das grandes dificuldades nessas reações é a remoção de água produzida no progresso da síntese, evitando o aumento do teor de água no meio reacional e, conseqüentemente, a inversão do sentido desejado da reação. Neste caso específico, são comuns procedimentos de remoção desse subproduto por técnicas adequadas como: borbulhamento de nitrogênio ou ar, evaporação simples, utilização de agentes dessecantes (peneiras moleculares ou pares de sais conjugados), destilação simples ou à pressão (FREITAS *et al.*, 2011).

Numa reação de esterificação catalisada por Lipozyme em heptano, De Castro *et al.* (1992), testaram diferentes técnicas de remoção de água (por borbulhamento de ar, lavagem com acetona seguido por borbulhamento e adição de peneira molecular). Todas três estratégias resultaram em quantidades similares de remoção de água da fase sólida (enzima e suporte). Apesar das peneiras moleculares terem reduzido a quantidade de água no meio reacional, a água formada durante a reação foi incorporada a enzima e teve um pequeno efeito no produto de conversão. Um decréscimo da conversão foi reportado para a reação de esterificação quando o período de contato da peneira molecular com a enzima foi superior a 12 h (DE CASTRO; ANDERSON, 1995).

Em escala industrial de bioconversão, a secagem com peneiras moleculares é impraticável devido à sua saturação, o que exige um esforço intenso para sua regeneração. Adicionalmente a forte afinidade das peneiras moleculares pela água pode causar uma excessiva desidratação da enzima. Mukesh *et al.* (1997), descreveram todos esses problemas usando uma lipase em reator tubular de ciclo com uma coluna de separação com peneira molecular. A regeneração da coluna de adsorção pode ser realizada independente da

saturação sem o rompimento da coluna.

Perevaporação é considerada um método atrativo para a remoção de água em sistemas orgânicos e livre de solvente especialmente em processos contínuos em larga escala. Enzimas podem ser imobilizadas para reduzirem o risco de perda da membrana. Água é removida a partir do sistema reacional por sorção seletiva por uma membrana homogênea polimérica e não porosa. Isto é seguido pela difusão seletiva através da membrana e evaporação até a fase vapor. As diferenças nas pressões parciais entre os dois tipos de membranas fornecem uma força de empuxo para o processo enquanto as diferenças de solubilidade dos componentes de reação na membrana fornecem esta seletividade. Este método foi testado com grande sucesso por Kwon *et al.* (1995), na reação de esterificação do ácido oleico e n-butanol catalisada pela Lipozyme em iso-octano a 25 °C. Uma conversão molar de 92% foi obtida com a evaporação do processo através da membrana de acetato de celulose comparado com 61% sem evaporação, depois de 140 min.

3.5.3 Influência do uso de lipases imobilizadas

Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias (α -hélice e a conformação β) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Com o objetivo de assegurar uma conformação enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula de enzima deve ter uma camada de hidratação definida (DE CASTRO; ANDERSON, 1995), separando o solvente do contato com a superfície da proteína e contribuindo para o aumento da sua flexibilidade interna. Outra maneira de proteger a configuração nativa da enzima é por meio de sua insolubilização em suportes sólidos. A imobilização da enzima tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização, também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas (DE CASTRO *et al.*, 2008).

A imobilização enzimática envolve basicamente 3 fatores: a enzima a ser imobilizada, o suporte e o método de imobilização. Existem diversos métodos de imobilização que são estudados e utilizados, porém deve ser realizado um estudo detalhado para seleção da enzima e do suporte, visto que as possibilidades de combinações são diversas. Pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de obter biocatalisadores com elevada atividade catalítica e estabilidade térmica, viabilizando economicamente o

bioprocesso, competindo assim com os processos convencionais utilizados industrialmente (DE CASTRO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2019).

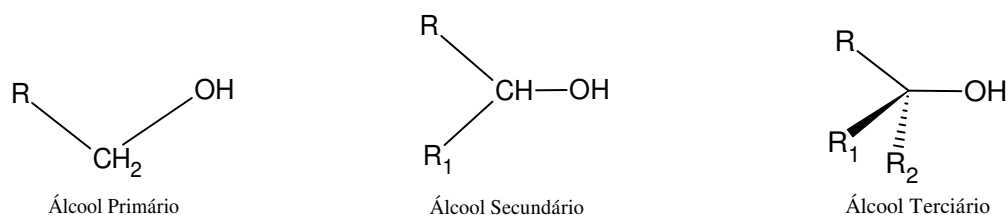
Uma decisão importante a ser tomada quando se procura estabelecer um método de imobilização enzimática é a escolha do suporte. Esta decisão é ainda mais complexa no caso da aplicação de lipases em reações enzimáticas envolvendo substratos como óleos e gorduras, uma vez que esses apresentam, naturalmente, alta viscosidade, o que dificulta os processos de escoamento e transferência de massa. Entre a grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, já estudados para a imobilização de lipases (DE CASTRO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2015), o copolímero de estireno/divinilbenzeno, devido à sua elevada área superficial e diâmetro de poros, vem se destacando como um dos mais adequados, na imobilização de diferentes lipases, para aplicação em reações de esterificação (RODRIGUES *et al.*, 2015; VILAS BÔAS *et al.*, 2018).

3.5.4 Efeitos do álcool

O efeito do álcool em reações de esterificação catalisadas por lipases pode ser verificado sob dois aspectos: tamanho da cadeia carbônica do álcool e estrutura do álcool.

No que diz respeito ao tamanho de cadeia carbônica, a atividade da lipase aumenta com o aumento da cadeia carbônica. De Castro; Moriya e Ribeiro (2000), avaliaram a possibilidade do uso de ácidos carboxílicos de cadeia carbônica curta (C4) e média (C8) na produção de ésteres aromatizantes naturais a partir de óleo fúsel. Conforme descrito pelos autores a influência do tamanho da cadeia carbônica foi marcante. Enquanto o ácido octanóico, promoveu elevados rendimentos de esterificação (conversões maiores que 90%), tanto nas temperaturas de 40 °C como a 60 °C, nas primeiras 24 h de reação, o ácido butírico forneceu rendimentos inferiores a 35%, independente da temperatura, mesmo após 48 h de incubação. Considerando que as reações de esterificação catalisadas por lipases são fortemente dependentes da polaridade do substrato, o baixo rendimento alcançado na síntese dos ésteres de butirato, foi atribuído à elevada polaridade do ácido butírico ($\log P = 0,81$).

Com relação a estrutura do álcool, dados descritos na literatura indicam que atividade da lipase é função da ligação do grupo funcional hidroxila (OH) ao número de átomos de carbono da cadeia do álcool (Figura 3.2), entretanto essa característica é dependente da fonte de lipase. Geralmente a atividade da lipase obedece a seguinte sequência em relação ao álcool: primário > secundário > terciário.

Figura 3.2 - Estruturas de álcoois primário, secundário e terciário

Fonte: próprio autor.

Um exemplo de estudo da influência dessas duas variáveis foi reportado por De Castro *et al.*, 1997 na síntese de ésteres terpenos utilizando como biocatalisador a preparação comercial de lipase imobilizada Lipozyme®. Empregando o álcool citronelol foi verificado que os ácidos de cadeia alifática contendo quatro ou mais carbonos foram excelentes substituintes no grupo acila, fornecendo taxas de esterificação entre 95 a 98%. Por outro lado, este tipo de preparação de lipase imobilizada apresentou sérias limitações para aplicação em reações de esterificação de alcoóis secundários e terciários (Figura 3.2), sendo, portanto, recomendado seu uso apenas na síntese de ésteres terpenóides derivados de alcoóis primários como citronelol, geraniol e nerol.

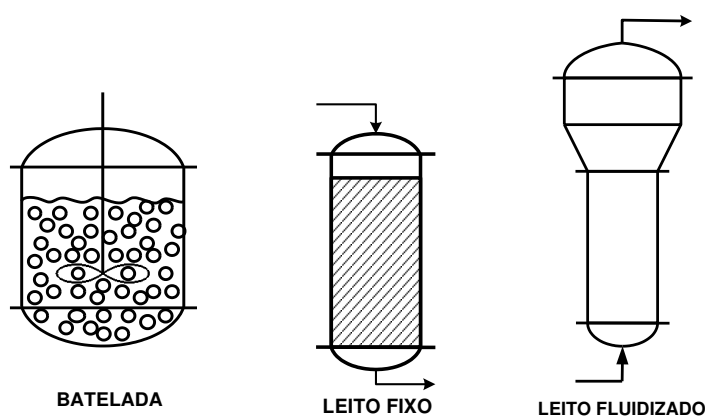
3.6 Biorreatores usados na produção de ésteres

Nas últimas décadas houve grande e rápido desenvolvimento no uso de enzimas para propósitos industriais, analíticos e médicos. A fim de tornar seu uso mais conveniente, este agente biológico tem sido imobilizado, assemelhando-se aos catalisadores de fase sólida da química convencional. Os tipos de biorreatores (Figura 3.3) que empregam enzimas imobilizadas mais comumente utilizados são: tanque agitado; leito fixo e leito fluidizado, sendo os dois últimos mais indicados por minimizarem a exposição da enzima imobilizada a elevados graus de cisalhamento e colisões (RATLEDGE; KRISTIENSEN, 2006; ZANIN; MORAES, 2014).

A seleção do tipo de biorreator a ser utilizado em processos com enzimas imobilizadas depende da análise criteriosa de uma série de fatores, tais como: (a) a forma da enzima imobilizada – partículas, membranas, fibras; (b) a natureza do substrato – solução, sólidos em suspensão, coloidal; (c) requisitos operacionais da reação – controle de pH, temperatura; (d) cinética da reação – inibição por substrato, produto, ou ambos; (e) a superfície catalítica por unidade de volume de reator; (f) características de transferência de

massa externa e interna; (g) facilidade de substituição do catalisador e sua regeneração; (h) facilidade de construção do biorreator; e (i) custo do biorreator. Nessa análise os pontos fundamentais são a natureza da solução de substrato e a cinética da reação enzimática (ZANIN; MORAES, 2014).

Figura 3.3 - Modelos de reatores para aplicações com enzimas imobilizadas



Fonte: Zanin; Moraes. (2014).

Desta forma, o emprego de biocatalisadores em processos industriais, em particular reações de esterificação, os biorreatores mais comumente utilizados são os reatores de tanque agitado e os reatores de leito fixo (PBR).

No reator de tanque agitado as partículas de biocatalisador são dispersas na solução de substrato, sendo a agitação promovida por agitadores mecânicos (ZANIN; MORAES, 2014). Este tipo de configuração é muito usado em escala de bancada devido a simples montagem do aparato, sendo a mais utilizada nos processos com enzimas em solução, entretanto, enzimas imobilizadas são também empregadas. Normalmente, a enzima é introduzida no reator juntamente com o substrato, sendo que o conteúdo é descarregado quando se alcança o grau de conversão desejado.

O processo pode ser operado com a adição de todos os componentes no início, considerando, que em alguns casos é recomendada a adição gradativa de um dos componentes do substrato, como por exemplo, na transesterificação de lipídeos com metanol (RODRIGUES *et al.*, 2010). A condução de um processo em regime de batelada é útil para coletar dados sobre o processo, como a cinética da reação.

Estes tipos de reatores têm sido os mais comumente apresentados na literatura para estudos com lipases (BALCÃO *et al.*, 1996). Entretanto, apresentam algumas desvantagens

para uso em escala industrial, uma vez que os sistemas imobilizados não podem ser carregados em grande quantidade no reator e estão susceptíveis a rupturas devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (FERNANDES, 2010).

Outros fatores negativos deste tipo de processo em larga escala são: necessidade de reatores de grande volume, longo período de reação e maior tempo na separação dos produtos, pois todos os estágios da reação são realizados no mesmo reator. Adicionalmente, o reator de tanque agitado requer longos períodos para alcançar boa produtividade industrial (LEVENSPIEL, 2000, RATLEDGE; KRISTIANSEN, 2006).

Os reatores de leito fixo têm a configuração de reator mais simples para alcançar um alto grau de contato entre as partículas sólidas de catalisador e os substratos líquidos. As enzimas imobilizadas podem ser recuperadas e reutilizadas facilmente, aumentando a viabilidade do processo contínuo. No entanto, o tempo de meia-vida do biocatalisador é um fator limitante devido à impossibilidade de interromper o processo e trocar frequentemente as partículas de catalisador. Deve-se ter cuidado para garantir que o catalisador tenha uma longa vida útil no reator para que ele possa funcionar continuamente com pouca manutenção. Reatores de leito empacotado com lipases imobilizadas em diferentes suportes são comuns em estudos em escala de laboratório, podendo ser destacados os trabalhos reportados por diversos grupos nacionais, incluindo síntese de biodiesel e biolubrificantes empregando *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte híbrido (SIMÕES *et al.*, 2015; CERON *et al.*, 2018), síntese de ésteres emulsificantes (laurato de isoamila) empregando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em estireno de divinilbenzeno (VILAS BÔAS *et al.*, 2018) e síntese de oleato de 2-etilhexila empregando lipase de *Candida antartica* imobilizada em suporte polimérico magnetizado (SILVA *et al.*, 2020).

3.7 Produtos alvo do projeto

Os lubrificantes, de uma forma geral, devem apresentar certas propriedades físico-químicas dentro de determinadas especificações, como por exemplo: viscosidade, índice de acidez, corrosividade, ponto de fluidez, entre outros. No caso dos biolubrificantes, geralmente constituídos por ésteres orgânicos, as estabilidades oxidativa, térmica e hidrolítica são essenciais, sendo a primeira uma das propriedades mais importantes no desenvolvimento de um lubrificante biodegradável (KOLWZAN; GRYGLEWICZ, 2003).

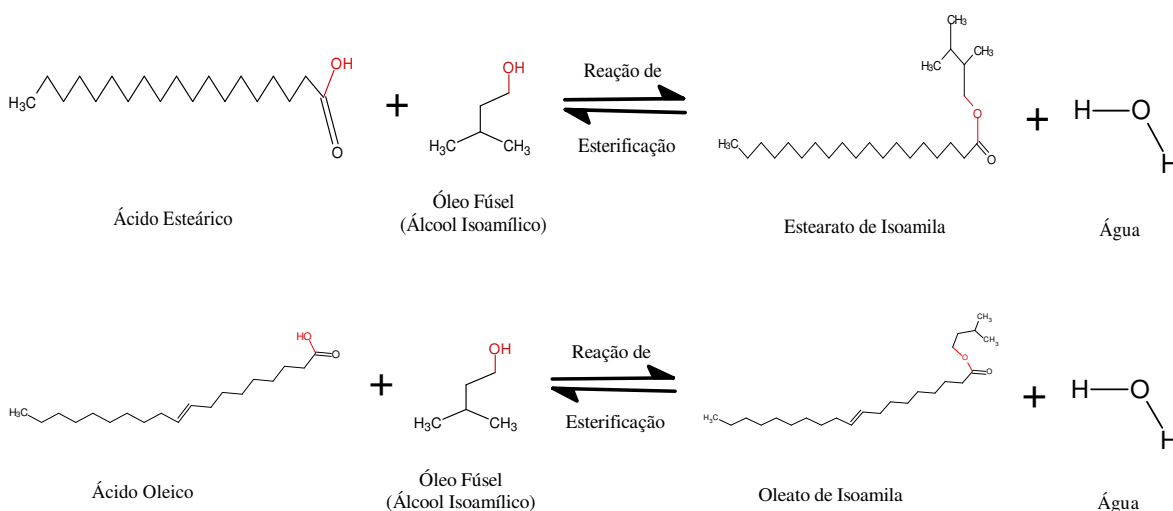
Industrialmente, ésteres de ácidos graxos de cadeia longa são sintetizados visando diversas aplicações, dentre elas, aromas, sabões, medicamentos, perfumes e cosméticos para a produção e modificações de componentes alimentares; biopesticidas e também como

biocombustíveis (DORMO *et al.*, 2004; NAKPONG; WOOTTHIKANOKKHAN, 2010; MAROUNEK *et al.* 2012; SILVA *et al.*, 2020; SIMÕES *et al.*, 2015).

Ésteres de ácidos graxos com 22 a 26 átomos de carbono, incluindo o estearato de isoamila e oleato de isoamila (23 átomos de carbono), têm sido utilizados como plastificantes e compostos lubrificantes para diferentes aplicações industriais e automotivas. Estes ésteres apresentam alta biodegradabilidade e baixa toxicidade, apresentando assim excelente combinação de propriedades ecológicas (LAGE *et al.*, 2016). Além disso, a presença do grupo éster em lubrificantes confere fluidez à baixa temperatura e reduz volatilidade a altas temperaturas. Ele também fornece uma afinidade para superfícies metálicas (SALIMON *et al.*, 2014).

Conforme já mencionado, este trabalho teve como foco a síntese dos ésteres estearato de isoamila e oleato de isoamila por esterificação dos ácidos graxos correspondentes e o álcool isoamílico (Figura 3.4), presente em maior concentração no óleo fúsel.

Figura 3.4 - Síntese dos ésteres de isoamila por esterificação do óleo fúsel e ácidos graxos correspondentes



Fonte: próprio autor.

3.8 Utilização do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres lubrificantes

O termo óleo fúsel (finkel), teve origem na Alemanha e se referia às frações inferiores de má qualidade (FERREIRA; MEIRELES; BATISTA, 2013). Atualmente o termo óleo fúsel é amplamente utilizado para designar a mistura de álcoois superiores, menos voláteis,

obtidos em várias fases do processo de purificação de álcool (PATIL *et al.*, 2002).

Os principais componentes do óleo fúsel são o etanol (13%), butanol (15%), álcool isoamílico (51%) e pequenas proporções de outros álcoois secundários e água (15%) (PÉREZ *et al.*, 2001). Além dos compostos listados anteriormente, Azania *et al.* (2010) relatam que sec-butanol, ésteres, alcanos e terpenos podem também se fazer presentes. O óleo fúsel pode ainda conter os álcoois hexílicos, heptílicos e octílicos em quantidades mínimas. Entretanto, o principal constituinte do óleo fúsel é o álcool isoamílico (AZANIA *et al.*, 2010), que provém da decomposição de iso-leucina, aminoácido proveniente da hidrólise de proteínas da levedura. Pérez *et al.* (2001), realizaram análises dos álcoois, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel obtidas de três indústrias produtoras de açúcar e álcool do estado de São Paulo. A Tabela 3.1 apresenta a composição média de três amostras de óleo fúsel e ratifica que o álcool isoamílico e o álcool isobutílico são os principais componentes, com taxas médias de 50% e 20% respectivamente.

Tabela 3.1 - Teores médios de álcoois, ésteres e aldeídos em amostras de óleo fúsel. Concentração média (g.L^{-1}) de três séries de amostras para cada usina

Composto	OF -1	OF -2	OF -3
Álcool metílico	26,9	17,7	5,0
Álcool etílico	46,9	12,0	26,4
Álcool n- propílico	14,5	6,5	14,6
Álcool isoamílico	380	367	425
Álcool isobutílico	133	140	201
Acetato de metila	ND	$8,7 \times 10^{-4}$	ND
Acetato de amila	$3,7 \times 10^{-4}$	ND	ND
3 – pentanol	$1,1 \times 10^{-4}$	ND	$8,3 \times 10^{-5}$
Álcool n- butílico	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-4}$
Acetato de hexila	$2,3 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-4}$
n- octanol	$1,4 \times 10^{-4}$	$9,8 \times 10^{-4}$	ND
n- decanol	$1,2 \times 10^{-4}$	ND	$9,0 \times 10^{-5}$
Álcool n- amílico	$1,7 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$
Formiato de etila	$1,1 \times 10^{-4}$	ND	$9,4 \times 10^{-4}$
Álcool 2 - butílico	$1,3 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$
Benzoato de metila	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-3}$
Acetaldeído	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,2 \times 10^{-3}$
Propionaldeído	$1,9 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$

Fonte: (PÉREZ *et al.*, 2001). ND: não detectados

O Quadro 3.2 fornece exemplos de reações de esterificação a partir do óleo fúsel com ácidos carboxílicos de distintos tamanhos da cadeia carbônica (variando do ácido acético ao

ácido oleico) empregando como catalisador lipase imobilizadas de diferentes fontes microbianas.

Quadro 3.2 - Processos descritos na literatura por vários autores referentes a esterificação do álcool isoamílico proveniente do óleo fúsel com diferentes ácidos graxos sob atuação de lipases de diferentes fontes

Enzima	Solvente	Substrato	Conversão molar (%)	Tempo de reação (h)	Referência
Lipozyme TL IM	hexano	ácido butírico /óleo fúsel	93	18	ANSCHAU <i>et al.</i> (2011)
Novozym 435	isento	ácido acético /óleo fúsel	75	8	GÜVENÇ <i>et al.</i> (2007)
Lipozyme TL IM	heptano	ácido láurico /óleo fúsel	92	8	DE CASTRO <i>et al.</i> (1999)
Novozym 435	isento	ácido oleico /óleo fúsel	99	6	DORMO <i>et al.</i> (2004)
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido propílico /óleo fúsel	72	24	MACEDO e PASTORE (1997)
<i>Rhizopus oryzae</i>	iso-octano	ácido oleico /óleo fúsel	96	24	VILAS BÔAS (2018)
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido caprílico /óleo fúsel	80	24	VILAS BÔAS <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido láurico /óleo fúsel	82	24	VILAS BÔAS <i>et al.</i> (2018)
<i>Candida cylindracea</i>	hexano	ácido butírico/ óleo fúsel	66	48	WELSH e WILLIAMS (1989)
		ácido acético /óleo fúsel	46	48	

Fonte: próprio autor.

Anschau *et al.* (2011), relataram produção máxima do éster butirato de isopentila sob condições de 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool: ácido de 1:1, concentração de enzima 0,02 g.mL⁻¹ e concentração de ácido butírico de 0,5 mol.L⁻¹. Sob essas condições ótimas foi obtido 92% de conversão molar e concentração de éster de 0,9 mol.L⁻¹. O álcool isoamílico obtido a partir de óleo fúsel foi utilizado nas mesmas condições resultando em 93% de esterificação e concentração de éster de 1,0 mol.L⁻¹.

Güvenç *et al.* (2007), reportaram resultados de conversão de 75% (3,40 mol.L⁻¹) em

8 h de reação catalisada pela lipase imobilizada da *Candida antarctica* (Novozym 435) em meio isento de solvente, e verificaram que variável mais significativa foi a razão molar ácido/álcool (0,2: 0,8). Ainda, Welsh e Williams (1989), reportaram produção máxima de uma mistura de éster de ácido butírico (0,62 mol.L⁻¹; rendimento = 65,8%) e éster de ácido acético (0,052 mol.L⁻¹; rendimento = 46,4%) em 48 h de reação utilizando a lipase *Candida cylindracea*. Desempenho superior foi obtido por De Castro *et al.* (1999) empregando um sistema reacional composto de ácido láurico e óleo fúsel e Lipozyme como biocatalisador obtendo resultados satisfatórios com rendimentos de 92% ao final de 8 h de reação.

Dormo *et al.* (2004), construíram um sistema com evaporação para ser utilizado na remoção da água produzida na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase Novozymes 435. O sistema foi adequado para obter altas conversões em condições ideais (rendimento = 99,8 % em 6 h de reação).

Macedo e Pastore (1997), testaram cinco lipases microbianas de *Geotrichum* sp, *Alcaligenes* sp, *Aspergillus* sp 1068, *Aspergillus* sp 1099 e *Rhizopus* sp, quanto à capacidade de catalisar a síntese de ésteres formadores de aroma por esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando óleo fúsel como precursor. A natureza da enzima, assim como o tamanho da cadeia dos ácidos afetaram as taxas de conversão obtidas. Os melhores resultados obtidos foram 88% de conversão na síntese de laurato de isoamila e 72% para propianato de isoamila pela lipase de *Rhizopus* sp após 24 h de incubação, seguido de 82% de conversão na síntese de acetato de isopropila por *Alcaligenes* sp após 24 h de incubação.

A formação de ésteres com propriedades aromatizantes (VILAS BÔAS *et al.*, 2017), emulsificantes (VILAS BÔAS *et al.*, 2018) e biolubrificantes (VILAS BÔAS, 2018) catalisada pela lipase de *Rhizopus oryzae*, imobilizada em suporte hidrofóbico foi investigada utilizando como precursor óleo fúsel e ácidos carboxílicos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica (C8:0, C12:0 e C18:1).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Lipases

Foram utilizadas preparações de lipases comerciais de origem microbiana de diferentes fontes, como: *Candida rugosa* (LCR, Tipo VII), *Candida antarctica* (CALB L) *Pseudomonas fluorescens* (LAK), *Penicillium camemberti* (LG) e *Thermomyces lanuginosus* (LTL) adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA). A lipase de *Rhizopus oryzae* (LRO), foi adquirida da Biocatalysts (Cardiff, Reino Unido). As enzimas adquiridas na forma livre foram posteriormente imobilizadas em suporte hidrofóbico adequado para utilização em reação de esterificação.

4.2 Suporte de imobilização

A resina polimérica comercial Diaion HP-20, sintetizada a partir do estireno e divinilbenzeno, foi adquirida da Aldrich (98%, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA). As características texturais deste suporte fornecidas pelo fabricante são apresentadas na Tabela 4.1

Tabela 4.1 - Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para o suporte Diaion HP-20

Matriz	Área superficial específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volume específico dos poros ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Diâmetro médio dos poros (Å)
Diaion HP-20	590	1,3	290

Fonte: Fabricante Product Diaion HP20, 2018.

4.3 Reagentes

Como materiais de partida foram utilizados: ácido esteárico (100%) e ácido oleico (99%) adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA), álcool isoamílico (min 99,5% Merck), iso octano (99,5%) obtidos da Cromoline Química Fina. Óleo fúsel foi gentilmente fornecido pela destilaria (São Martinho S/A - Unidade Iracema, localizada em Iracemópolis - São Paulo) com composição aproximada de 64,98% de álcool isoamílico, 7,86% de álcool isobutílico, 0,38% de álcool n-butílico, 1,27% de álcool n-propílico e 9,22% de álcool etílico e 14,76% de água, conforme laudo fornecido pela destilaria (Apêndice A).

4.4 Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: álcool etílico (95%), hidróxido de potássio (min. 85%) e hexano adquiridos da Cromoline (São Paulo), octanol (Merck), heptano, polietilenoglicol – PEG-1.500 e goma arábica em pó pura (Synth). Azeite de oliva com baixa acidez (Carbonell, adquirido em mercado local). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

4.5 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Cromatógrafo a gás modelo GC-3800 (Varian, Estados Unidos) para dosagens dos álcoois consumidos e ésteres formados, RMN 300MHz modelo Mercury (Varian) para caracterização dos produtos formados e padrões cromatográficos, viscosímetro (Modelo LVDVIIIICP-CP 520, BrookField), titulador automático Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000). Outros equipamentos para procedimentos rotineiros, tais como: balança analítica acoplado com lâmpada de IV Modelo ID 50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda), potenciômetro modelo mPA-210 (Spencer), placa provida de agitação magnética e temperatura controladas modelo 752A (Fisatom, Brasil).

4.6 Metodologia experimental

4.6.1 Tratamento do óleo fúsel

O elevado teor de água originalmente presente no óleo fúsel foi reduzido inicialmente por destilação fracionada, seguido de técnicas de desidratação com sais inorgânicos e peneiras moleculares de 3Å (Silicato de sódio e alumínio) (VILAS BÔAS, 2018). A concentração de água presente no óleo fúsel foi medida em titulador automático Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000).

4.6.2 Imobilização das lipases no suporte polimérico

O suporte polimérico Diaion HP-20, foi embebido em heptano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, retirou-se o excesso de heptano e para cada grama de suporte (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase na sua forma livre, empregando como agente estabilizante da enzima 100 µL de

solução aquosa contendo $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de polietilenoglicol (massa molecular 1500). As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob agitação a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens sucessivas com heptano para remoção do excesso de umidade. Em seguida, os derivados foram acondicionados em dessecador sob vácuo para redução da umidade em valores inferiores a 10%.

4.6.3 Síntese dos ésteres em regime descontínuo

As reações de esterificação do álcool isoamílico ou óleo fúsel com os ácidos esteárico e oleico foram efetuadas em reatores de tanque agitado e fechado de 50 mL, operando em regime descontínuo usando o sistema ilustrado na Figura 4.1. As misturas álcool e ácido na presença do solvente iso-octano, foram incubadas com as diferentes preparações de lipase imobilizada com carregamento catalítico de 400 unidades de atividade por grama de meio reacional, por um período máximo de 96 h, para a obtenção do estearato de isoamila e 120 h, para a obtenção do oleato de isoamila, com agitação magnética (150 rpm) a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Amostras foram retiradas em intervalos periódicos para quantificação do consumo dos materiais de partida e formação do produto por cromatografia em fase gasosa.

Figura 4.1 - Esquema da reação de esterificação do álcool isoamílico ou óleo fúsel com ácido esteárico ou oleico



Fonte: próprio autor

4.6.4 Delineamento experimental

A influência das variáveis: razão molar (X_1) e temperatura (X_2) no rendimento de

esterificação do óleo fúsel com os ácidos esteárico ou oleico empregando as preparações de lipase imobilizada selecionadas anteriormente foi determinada por um planejamento composto de face centrada 2^2 e pontos centrais, cujas variáveis codificadas estão apresentadas na Tabela 4.2. As esterificações foram conduzidas em reatores fechados de 50 mL contendo 20 mL de substrato constituído de óleo fúsel previamente desidratado e ácido esteárico ou oleico nas razões molares entre ácido/álcool de 0,75:1 a 1,25:1 (a proporção de óleo fúsel adicionado foi calculada com base na concentração de álcool isoamílico presente neste resíduo). As misturas foram incubadas com a preparação de lipase imobilizada, com carregamento catalítico de 350 unidades de atividade por grama de meio reacional, por um período máximo de 48 h, com agitação magnética (150 rpm) na faixa de temperatura entre 40 a 50 °C. Amostras foram retiradas em intervalos periódicos para quantificação do consumo do álcool e concentração dos ésteres formados por cromatógrafo de fase gasosa. O consumo dos ácidos graxos foi quantificado por titulação volumétrica.

Tabela 4.2 - Valores reais e codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial 2^2 com face centrada.

Variáveis independentes	Níveis codificados		
	-1	0	+1
X ₁ – Razão molar ácido/álcool	0,75:1	1:1	1,25:1
X ₂ – Temperatura °C	40	45	50

Fonte: próprio autor.

Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica. Como variável resposta foi considerado o teor do éster formado. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statistica 13.

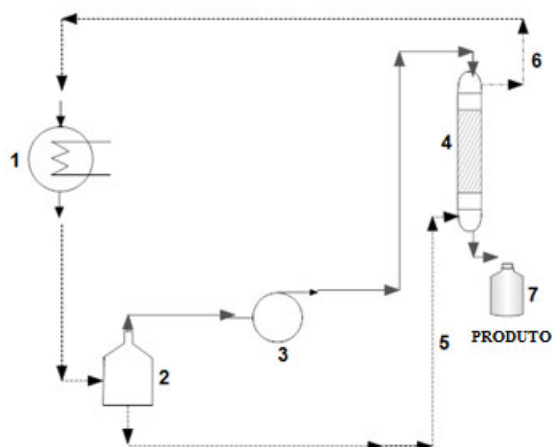
4.7 Síntese de ésteres em regime contínuo

As reações em regime contínuo foram efetuadas em reator de leito fixo de um estágio usando o sistema ilustrado na Figura 4.2. A coluna apresentava dimensões fixas (diâmetro = 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 10 mL) e o carregamento das lipases imobilizadas foi ajustado em 80% do leito catalítico. Todos os experimentos foram efetuados a 45 °C com tempo espacial variável dependendo do objetivo. O progresso das reações de esterificação foi monitorado pelo recolhimento de amostras na saída do reator e o consumo do álcool isoamílico e formação dos ésteres foram determinados por cromatografia gasosa. O consumo dos ácidos graxos foi determinado pela titulação com KOH 0,05 mol.L⁻¹ e fenolftaleína como

indicador, e o teor de água formada determinado diretamente em titulador Karl Fischer.

O meio de alimentação era constituído por óleo de fúsel e ácidos esteárico ou oleico na razão molar predita pelo planejamento na presença de iso-octano. O teor de água no substrato foi mantido em valores inferiores a 500 ppm. O substrato foi continuamente bombeado (bomba peristáltica SJ-1211-Hatto, ATTO, Japão) de um reservatório a 45 °C para o reator em fluxo descendente em diferentes vazões.

Figura 4.2 - Esquema experimental das reações em reator de leito fixo operando em regime contínuo. (1) banho termostático, (2) vaso de meio de alimentação, (3) bomba peristáltica, (4) leito catalítico, (5) e (6) linha de recirculação de água de aquecimento, (7) coleta de produto formado



Fonte: próprio autor.

4.8 Purificação dos ésteres de isoamila

Os ésteres formados nas reações de esterificação foram coletados e transferidos para um funil de decantação e neutralizado com uma solução de Na_2CO_3 a 5% m.v⁻¹ (relação de volume 1:1), seguido pela adição de NaCl para separar as fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi destilada para remover qualquer presença de óleo fúsel residual e o produto formado analisado de acordo com as propriedades de interesse.

4.9 Métodos de análise

4.9.1 Teor de umidade das enzimas imobilizadas

O teor de umidade das enzimas imobilizadas foi determinado medindo-se a perda de

massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (0,1 g) em balança analítica acoplada com infravermelho a 100 °C (IV Modelo AY 220, Shimadzu).

4.9.2 Teor de água nas amostras da fase líquida do sistema reacional

O teor de umidade das amostras na fase líquida foi medido diretamente em um Titulador automático de Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000).

4.9.3. Determinação da atividade hidrolítica das lipases

4.9.3.1 Método de hidrólise do azeite de oliva

As atividades enzimáticas das lipases livres e imobilizadas foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita por Vilas Bôas *et al.* (2017). Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de KOH previamente padronizada (0,04 mol.L⁻¹) utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a equação 4.1 e expressas em μmol.g⁻¹.min⁻¹ (U.g⁻¹).

Equação 4.1 - Atividade Hidrolítica (método azeite de oliva)

$$\text{Atividade hidrolítica (} \mu\text{mol. g}^{-1}\text{. min}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (4.1)$$

Em que: V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra; V_b = volume do KOH gasto na titulação do branco; M = concentração em mol. L⁻¹ da solução de KOH; t = tempo de reação em min; m = massa em gramas.

4.9.3.2 Método de hidrólise do butirato de metila

As atividades enzimáticas das lipases livres e imobilizadas foram determinadas pelo método de hidrólise do butirato de metila. O substrato foi preparado pela diluição de 1% de butirato de metila em tampão fosfato pH 7,0 (0,25 mol.L⁻¹). Em frascos Erlenmeyer de 125mL foram adicionados: 10 mL de substrato e 0,05g de enzima imobilizada (dependendo da enzima). Os frascos foram incubados a 40 °C por 10 min, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de

mistura de acetona e etanol (1:1). O ácido butírico liberado foi titulado com uma solução de KOH previamente padronizada (0,04 mol.L⁻¹) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido butírico por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a equação 4.2 e expressas em μmol.g⁻¹.min⁻¹ (U.g⁻¹).

Equação 4.2 - Atividade Hidrolítica (método butirato de metila)

$$\text{Atividade hidrolítica (} \mu\text{mol. g}^{-1}\text{. min}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (4.2)$$

Em que: V_a = volume de KOH gasto na titulação da amostra; V_b = volume do KOH gasto na titulação do branco; M = concentração em mol. L⁻¹ da solução de KOH; t = tempo de reação em min.; m = massa em gramas.

4.9.4 Determinação da atividade de esterificação

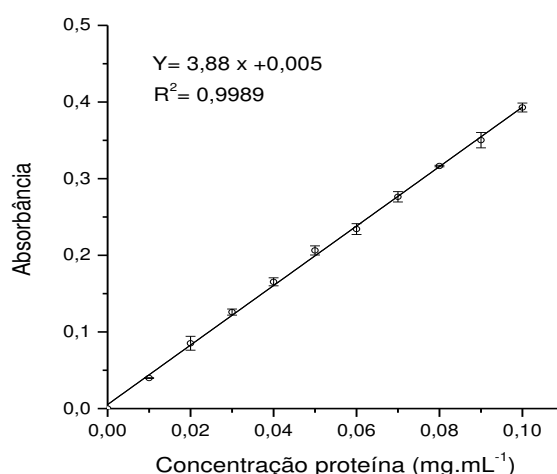
A atividade de esterificação foi determinada pela formação do estearato de etila ou oleato de etila na reação de etanol com ácidos esteárico ou oleico em meio iso-octano a 45 °C, empregando 0,5 g da preparação de lipase. A reação foi iniciada pela adição da lipase ao meio reacional (12 mL), sendo 10,1 mL de ácido esteárico ou oleico e 1,9 mL etanol, em frasco fechado de 50 mL sob agitação de 150 rpm. Alíquotas (100 μL) foram retiradas do meio reacional em intervalos pré-determinados para quantificação do consumo do ácido. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que conduz à formação de 1 μmol de éster por minuto nas condições do ensaio. O cálculo da atividade foi baseado no coeficiente angular da parte linear da curva de concentração de produto em função do tempo.

4.9.5 Determinação do teor de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas foi efetuada pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado pela diluição de 100 mg do corante Coomassie Brilliant Blue BG-250 em 50 mL de etanol, seguida da adição de 100 mL de ácido fosfórico 85% (m.v⁻¹). A mistura foi diluída até 1 L e armazenada a 4 °C. Para cada 0,1 mL da amostra problema adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford, e após 5 min de incubação, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro (Varian modelo Carry 100) a 595nm. As

análises foram feitas em triplicata e a concentração das proteínas foi determinada tomando como base os valores da curva de calibração previamente construída relacionando absorbância e concentração de soro albumina bovina como padrão na faixa de 0,01-0,1 mg. mL⁻¹, como mostra a Figura 4.3.

Figura 4.3 - Curva de calibração de proteína pelo método de Bradford, utilizando a albumina como padrão



Fonte: próprio autor.

4.9.6 Determinação da concentração de ácidos graxos

A determinação da concentração dos ácidos esteárico ou oleico foi realizada conforme a metodologia descrita por Vilas Bôas *et al.* (2017). Em Erlenmeyers de 150 mL, foram adicionados 0,1 g da amostra e 10 mL de álcool etílico a 95% e titulado com solução 0,04 mol.L⁻¹ de KOH e fenolftaleína, como indicador. A quantificação de ácidos residuais foi calculada pela equação 4.3.

Equação 4.3 - Concentração de Ácidos Graxos

$$AGL(g.L^{-1}) = \frac{V.[KOH].MM}{m} \quad (4.3)$$

Em que: V = Volume gasto de KOH na titulação (mL); [KOH] = Concentração em mol. L⁻¹ da solução de KOH; MM = Massa molar do ácido esteárico ou oleico titulado; m = Massa da amostra (g).

4.9.7 Determinação dos produtos formados e álcool consumido

As concentrações dos ésteres formados e álcool consumido foram quantificadas em cromatógrafo de fase gasosa (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA) equipado com detector de chama ionizante e acoplado a coluna capilar (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme). Para a quantificação dos ésteres e do álcool isoamílico foi desenvolvido o método como sumarizado no Quadro 4.1, utilizando octanol como padrão interno.

Quadro 4.1 - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação dos ésteres estearato de isoamila e oleato de isoamila e do álcool isoamílico

Parâmetro	Condição
Rampa de temperatura	40 °C (1 min), 70 °C (3 min), 120 °C (3 min), taxa de aquecimento de 20 °C min^{-1} , seguida de 250 °C (5min) numa taxa de 25 °C. min^{-1}
Coluna capilar	TR-FAME - Comprimento 30m x 0,25mm Diâmetro 0,25 μm
Gás de arraste	Nitrogênio (2 mL. min^{-1})
Padrão interno	Octanol (10 g.L ⁻¹)
Diluição da amostra	1:50 ou 1:20 (amostra - hexano)
Injeção da amostra diluída	1:1 (amostra: padrão interno)
Injeção da amostra diluída	1:1 (amostra: padrão interno)
Tempo total de análise	21,2 min
Tempos de retenção	
PI	8,30 min
Álcool isoamílico	3,80 min
Éster	15,53 min

Fonte: próprio autor.

4.9.8 Propriedades dos ésteres purificados

As estruturas dos ésteres sintetizados por via química e enzimática foram confirmadas pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN^1H) e RMN^{13}C . Os espectros foram obtidos no aparelho Varian modelo Mercury 300 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelo sinal do TMS (Tetra-metil-silano - $\delta = 0$) em solvente CDCl_3 . Cada espectro foi analisado calculando-se a integração dos números relativos de hidrogênio presente na estrutura química do éster de ácido em 0,00-6,00 ppm.

As amostras de ésteres sintetizadas por via enzimática foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier para caracterizar a composição do material. As análises foram conduzidas em espectrômetro de modelo Spectrum GX (Perkin Elmer) empregando o método de transmissão na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} usando cristais de KBr, sendo medidos os valores de absorbância. Foram feitas 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr, utilizando-se cerca de 2 mg da amostra seca e 20 mg de KBr.

Os valores da viscosidade absoluta dos produtos purificados foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram realizadas a 40 °C empregando 1,0 mL de fluido. A densidade dos ésteres foi determinada em densímetro digital Modelo DMA 35N EX (Anton Paar). As medidas foram realizadas a 20 °C utilizando 2 mL de amostra.

4.10 Tratamento dos dados

4.10.1 Rendimento de imobilização das lipases em STY-DVB

O rendimento de imobilização (*RI*) foi calculado pela relação entre a atividade enzimática imobilizada pela atividade inicialmente oferecida ao suporte de imobilização. Nos ensaios de imobilização das lipases em STY-DVB a atividade recuperada no suporte foi calculada pela equação 4.4.

Equação 4.4 - Rendimento de imobilização

$$RI \text{ (\%)} = \frac{U_{ads}}{U_0} \times 100 \quad (4.4)$$

Em que: U_{ads} = unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa seca); U_0 = unidades de atividade oferecidas para imobilização.

4.10.2 Ensaios de esterificação

Nos ensaios de síntese dos ésteres, os resultados foram tabulados, graficados e analisados considerando-se como fator resposta a conversão molar dos materiais de partida (álcool ou ácido), conforme equação 4.5.

Equação 4.5 - Conversão molar

$$\text{Conversão molar (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (4.5)$$

Em que: C_0 = concentração inicial do reagente; C = concentração final do reagente no tempo considerado.

4.10.3 Tempo espacial (τ)

O tempo espacial dos testes conduzidos em regime contínuo foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as Equações 4.6 a 4.8. O progresso da esterificação foi monitorado por amostras coletadas na saída do reator para determinar os níveis de ambos os materiais de partida consumidos e o produto formado.

Equação 4.6, 4.7 e 4.8 - Tempo espacial

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (4.6)$$

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad (4.7)$$

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{w}{\rho} \quad (4.8)$$

em que: τ = é o tempo espacial (min), V = volume útil do reator (mL), v_0 = vazão volumétrica sobre a seção da coluna (mL.min⁻¹), V_{reator} = volume total do reator, $V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator, w = massa seca do biocatalisador (g), ρ = densidade cristalina do biocatalisador (g.mL⁻¹).

4.10.4 Produtividade

As produtividades foram definidas e calculadas para as reações de esterificação em regime contínuo e descontínuo de acordo com a Equação 4.19 e 4.10, respectivamente:

Equação 4.9 - Produtividade em regime contínuo

$$P_c = \frac{C \cdot Q}{M_{cat}} \quad (4.9)$$

Em que: P_c = produtividade processo contínuo (mmol éster. g catalisador⁻¹.h⁻¹); C = concentração de ésteres à saída do reator (mmol.L⁻¹meio); Q = vazão de coleta de produto (L. h⁻¹), M_{cat} = massa do catalisador (g cat).

Equação 4.10 - Produtividade em regime descontínuo

$$P_d = \frac{C}{t \cdot M_{cat}} \quad (4.10)$$

Em que: P_d = produtividade (μmol. L⁻¹.g catalisador⁻¹. min⁻¹); C = concentração do éster formado (mol.L⁻¹); t = tempo reacional considerado (min); M_{cat} = massa do catalisador (g catalisador).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Propriedades das preparações enzimáticas

Seis preparações de lipases comercializadas por diferentes fornecedores foram utilizadas na execução do presente trabalho. A caracterização dessas preparações foi uma etapa preliminar necessária, tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos fabricantes são determinados na maioria dos casos por métodos diversos. Desta forma, na Tabela 5.1 são apresentados os valores das atividades hidrolíticas dessas preparações empregando métodos de análise baseados na hidrólise do azeite de oliva e na hidrólise do butirato de metila, conforme procedimento descrito nas seções 4.9.3.1 e 4.9.3.12. A Tabela 5.1 também inclui a concentração de proteína de cada preparação.

Tabela 5.1 - Propriedades das lipases testadas na forma livre

Fonte de Lipase	Sigla	Proteína (mg.g ⁻¹)	Atividade hidrolítica (U.g ⁻¹)	
			Azeite de oliva	Butirato de metila
<i>C. rugosa</i>	LCR	43,38 ± 3,61	31.605 ± 161	1.049 ± 41
<i>C. antarctica</i>	CALB L	83,59 ± 1,49	nd	2.691 ± 52
<i>R. oryzae</i>	LRO	93,20 ± 1,89	45.858 ± 183	508 ± 33
<i>P. camemberti</i>	LG	7,85 ± 0,33	nd	199 ± 7
<i>P. fluorescens</i>	LAK	37,76 ± 2,95	21.483 ± 142	259 ± 3
<i>T. lanuginosus</i>	LTL	170,05 ± 5,87	34.497 ± 155	288 ± 5

Fonte: próprio autor.

As atividades hidrolíticas das lipases livres testadas apresentaram ampla faixa de variação entre 21.483 a 45.858 U.g⁻¹, para o método do azeite de oliva e 199 a 2.691 U.g⁻¹ para o método do butirato de metila. Esse parâmetro é interessante por permitir uma comparação da atividade catalítica da enzima sobre um determinado substrato. Deve ser destacado que a lipase de *Candida antarctica* e *Penicillium camemberti*, não foram quantificadas pelo método de hidrólise do óleo de oliva por apresentarem especificidade limitada para hidrólise de triacilgliceróis.

Adotando o procedimento descrito no item 4.6.2, o suporte STY-DVB foi utilizado para imobilizar as diferentes fontes de lipases. A Tabela 5.2 apresenta os dados referentes

aos teores de umidade, atividades hidrolítica, recuperada e sintética de cada preparação de lipase.

Especial atenção foi dada ao procedimento experimental de imobilização para se obter derivados imobilizados com teores de umidade < 10%, tendo em vista que elevados teores de água podem favorecer a reação de hidrólise, reduzindo conseqüentemente o rendimento da esterificação.

A atividade hidrolítica do derivado imobilizado é de crucial importância, pois além de fornecer dados referentes à recuperação de atividade catalítica no suporte (rendimento de imobilização), foi utilizada no cálculo da massa do biocatalisador para mediar a reação de esterificação. Conforme determinado em trabalhos anteriores (VILAS BÔAS *et al.*, 2018), uma quantidade mínima de 400 unidades de atividade hidrolítica por grama de substrato é necessária para se alcançar um bom rendimento de esterificação.

Tabela 5.2 - Atividade hidrolítica, recuperada e sintética das lipases imobilizadas em STY-DVB

Lipase	Umidade (%)	Atividade hidrolítica (U.g ⁻¹)		Atividade Recuperada (%)	Atividade sintética (U.g ⁻¹)	
		Azeite de oliva	Butirato de metila		Estearato de etila	Oleato de etila
LCR	7,5	4.128 ± 40	604,3 ± 30	53,1	221±0,98	256±0,60
CALB L	5,3	nd	266,2 ± 25	44,1	239±0,31	246±0,23
LRO	5,5	3.391 ± 20	58,8 ± 3	31,5	245±0,14	312±0,61
LG	6,0	nd	71,1 ± 10	36,7	221±0,10	255± 0,18
LAK	5,3	2.033 ± 20	165,3 ± 23	38,2	209± 0,98	210± 0,65
LTL	4,3	1.995 ± 10	88,3 ± 15	22,4	265± 0,22	212 ± 0,30

Fonte: próprio autor.

Como demonstrado na Tabela 5.2, todas as preparações de lipase imobilizada no suporte STY-DVB apresentaram elevada atividade catalítica, demonstrando que o procedimento de imobilização foi efetuado com sucesso. A atividade mais elevada foi obtida para a lipase de *Candida rugosa* cerca de 4.128 U.g⁻¹ com recuperação de atividade no suporte de 53,1%. Por outro lado, todas as lipases imobilizadas apresentaram atividades de esterificação similares, independente do ácido graxo usado (ácido esteárico ou ácido oleico).

5.2 Seleção da fonte de lipase para síntese do estearato de isoamila

Inicialmente, as seis preparações de lipases imobilizadas em STY-DVB foram usadas

como catalisadores na reação de esterificação do ácido esteárico com álcool isoamílico, com o objetivo de selecionar o derivado imobilizado que fornecesse formação mais elevada do éster lubrificante a partir de álcool secundário e ácido graxo de cadeia longa saturado (C 18:0).

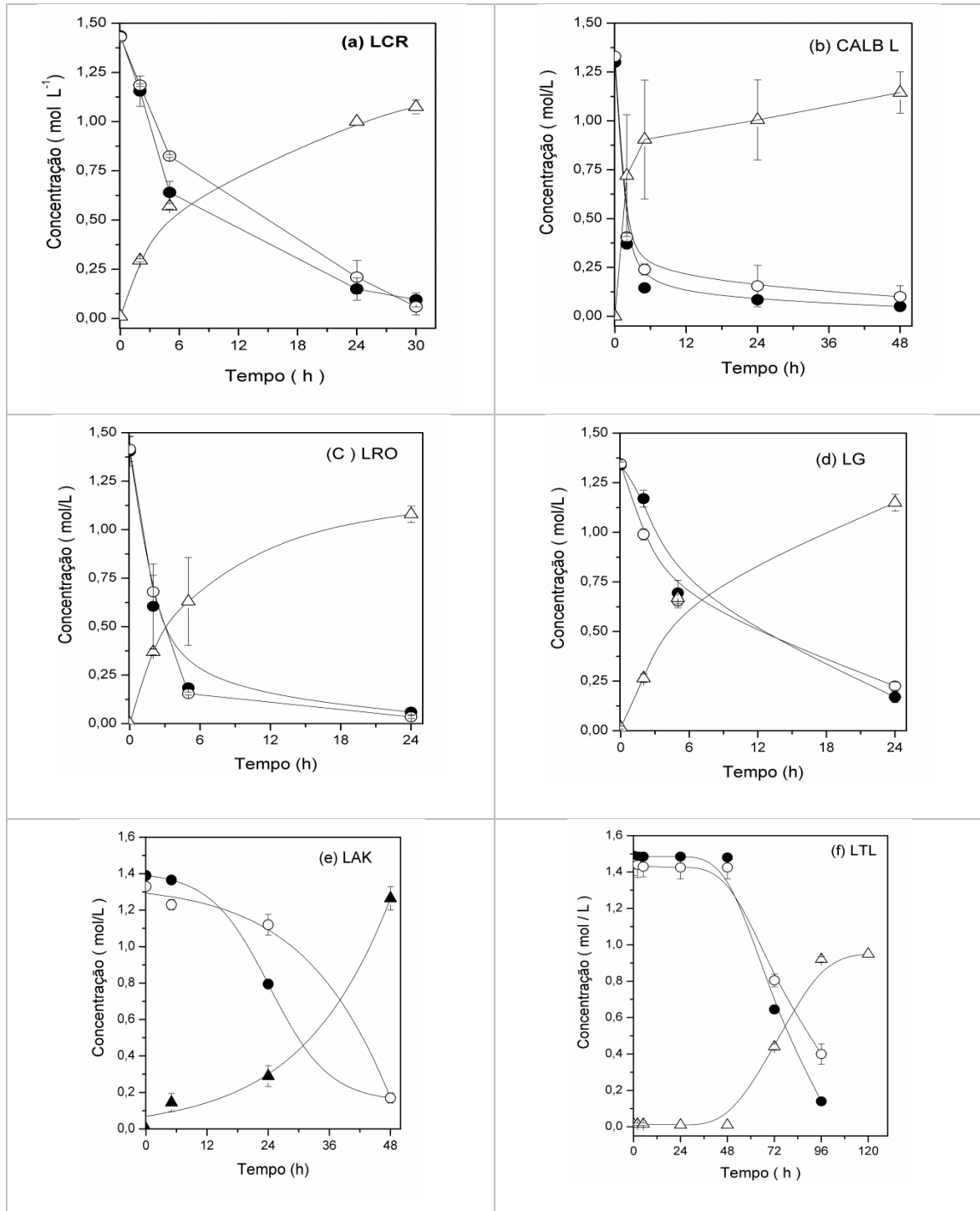
Todos os experimentos foram efetuados em meio contendo iso-octano como solvente, tendo sido estabelecido os seguintes parâmetros: razão molar de 1:1 entre ácido e álcool e temperatura reacional de 45 °C. O perfil de consumo do ácido esteárico e do álcool isoamílico, bem como formação do estearato de isoamila durante o progresso da reação de esterificação catalisada pelas seis lipases em função do tempo é mostrado na Figura 5.1 (Apêndice B).

A observação da Figura 5.1 indica que todas as lipases testadas foram capazes de formar estearato de isoamila. No entanto, a incorporação de ácido esteárico no álcool isoamílico foi dependente da fonte de lipase, que pode ser correlacionado com a especificidade de cada biocatalisador. Dependendo da fonte de lipase a maior conversão ocorreu entre 24 a 48 h, quando foram determinadas as menores concentrações dos materiais de partida (maior conversão molar). Para todas as reações não foi observada reação reversa e ambos os materiais de partida foram consumidos simultaneamente.

Entre todas as lipases imobilizadas em STY-DVB, as lipases de *R. oryzae* (LRO), *C. antarctica* sp (CALB L) e *P. camemberti* (LG), forneceram as conversões molares mais elevadas ($\cong 90\%$ em 24h). Desempenho ligeiramente menor foi obtido pelas lipases de *C. rugosa* (LCR) e *P. fluorescens* (LAK), que necessitaram de um período adicional de 24h, para atingir as mesmas conversões molares. A lipase de *T. lanuginosus* (LTL) forneceu o menor desempenho, atingindo a máxima conversão em 96 h ($\cong 90\%$). Desta forma, esta preparação de lipase foi considerada ineficaz para a reação proposta.

De acordo com os resultados resumidos na Tabela 5.3, dentre todas as lipases testadas, três fontes de lipase demonstraram elevada atividade na formação de estearato de isoamila em 24 h ($> 350 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cat} \cdot \text{min}^{-1}$). No entanto, apenas a lipase de *Rhizopus oryzae* proporcionou consumo praticamente total de ambos materiais de partida em 24 h.

Figura 5.1 - Perfil de consumo do álcool isoamílico (\circ) e do ácido esteárico (\bullet) e formação do éster estearato de isoamila (\triangle), durante o progresso da reação de esterificação catalisada pelas lipases: (a) *Candida rugosa*, (b) *Candida antarctica*, (c) *Rhizopus oryzae*, (d) *Penicillium camemberti*; (e) *Pseudomonas fluorescens*; (f) *Thermomyces lanuginosus* imobilizadas em STY-DVB



Fonte: próprio autor.

Tabela 5.3 - Esterificação do álcool isoamílico com ácido esteárico catalisada por diferentes fontes de lipase imobilizadas em STY-DVB

Fonte de lipase	Conversão molar (%)		Tempo de reação (h)	Concentração do éster (mol.L ⁻¹)	Produtividade em éster (μmol.L ⁻¹ .g ⁻¹ .min ⁻¹)
	Ácido	Álcool			
LCR	96,16±0,47	95,78±2,91	48	1,08±0,05	248,9±1,15
CALBL	96,15±0,03	91,35±2,66	24	1,15±0,11	349,0±1,11
LRO	95,07±1,74	94,09±4,23	24	1,08±0,04	375,1±1,47
LG	87,30±2,25	83,26±1,85	24	1,15±0,04	399,3±1,48
LAK	88,56±1,85	88,15±2,03	48	1,27±0,06	220,0±0,70
LTL	91,28±0,95	86,58±0,05	96	1,31±0,02	113,4±1,90

Fonte: próprio autor.

5.3 Seleção da fonte de lipase para síntese do oleato de isoamila

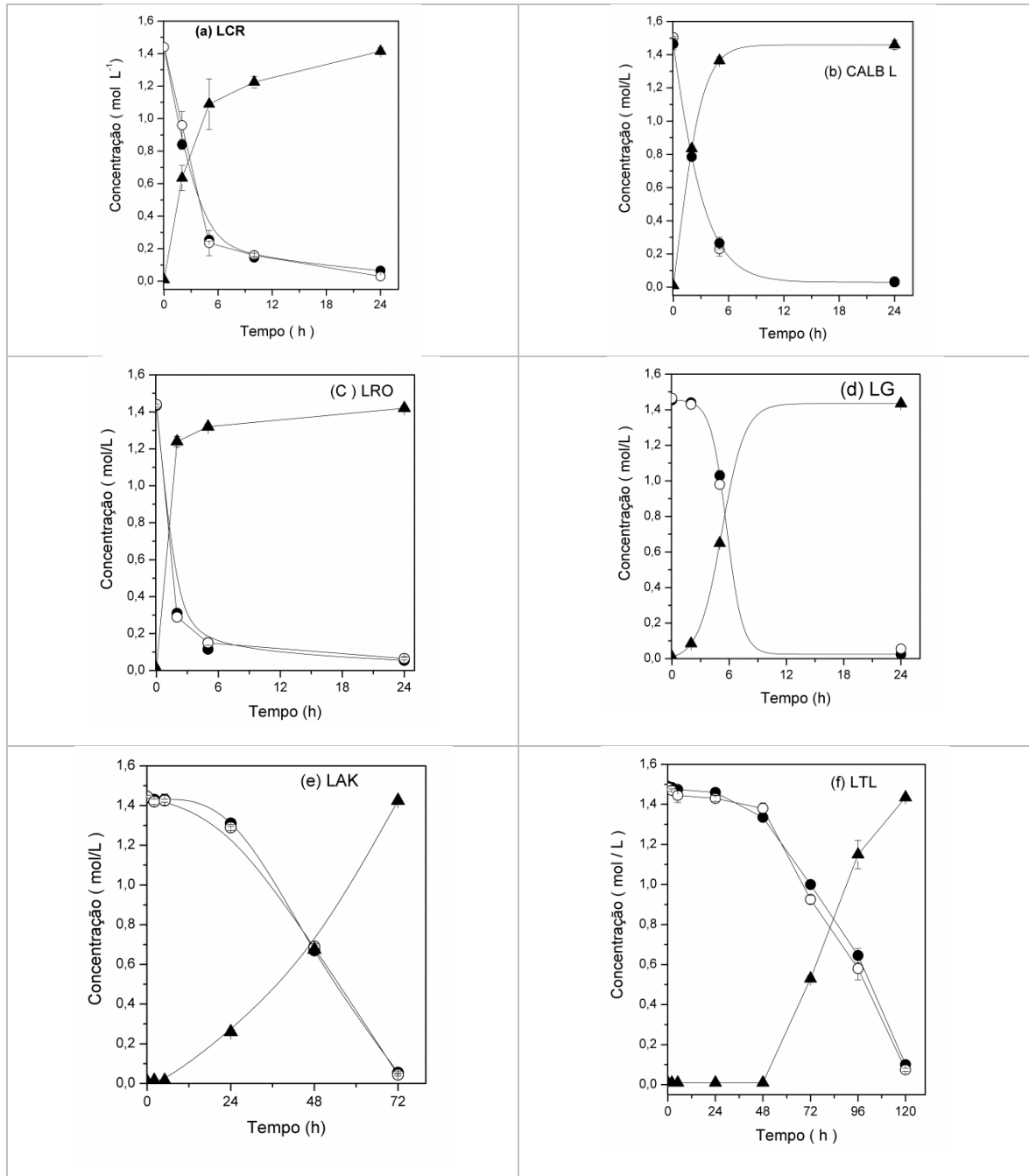
As seis preparações de lipases imobilizadas em STY-DVB foram também usadas como catalisadores na reação de esterificação do ácido oleico com álcool isoamílico, com o objetivo de selecionar o derivado imobilizado que fornecesse formação mais elevada do éster lubrificante a partir de álcool secundário e ácido graxo de cadeia longa insaturado (C 18:1).

Todos os experimentos foram efetuados em meio contendo iso-octano como solvente, tendo sido estabelecido os seguintes parâmetros: razão molar de 1:1 entre ácido e álcool e temperatura reacional de 45 °C. O perfil de consumo do ácido oleico e do álcool isoamílico, bem como formação do oleato de isoamila durante o progresso da reação de esterificação catalisada pelas seis lipases em função do tempo é mostrado na Figura 5.2 (Apêndice C).

A observação da Figura 5.2 indica que todas as lipases testadas foram capazes de formar oleato de isoamila. Para todas as reações não foi observada reação reversa e ambos os materiais de partida foram consumidos simultaneamente. No entanto, a incorporação de ácido oleico foi dependente da fonte de lipase, que pode ser correlacionado com a especificidade de cada biocatalisador.

Com exceção das lipases *Pseudomonas fluorescens* e *Thermomyces lanuginosus* imobilizadas em STY-DVB (conversão molar < 10% em 48 h), as quatro outras lipases testadas forneceram conversões molares dos materiais de partida superiores a 95% em 12 h de reação. A lipase de *Candida rugosa* (Figura 5.2a) apresentou comparativamente a menor velocidade de reação, requerendo 24 h para atingir conversão total dos materiais de partida.

Figura 5.2 - Perfil de consumo do álcool isoamílico (\circ) e do ácido oleico (\bullet) e formação do éster oleato de isoamila (\blacktriangle), durante o progresso da reação de esterificação catalisada pelas lipases: (a) *Candida rugosa*, (b) *Candida antarctica*, (c) *Rhizopus oryzae*, (d) *Penicillium camemberti*; (e) *Pseudomonas fluorescens*; (f) *Thermomyces lanuginosus* imobilizadas em STY-DVB



Fonte: próprio autor.

De acordo com os resultados resumidos na Tabela 5.4, três fontes de lipases (CALB L, LRO e LG), demonstraram elevada atividade na formação de oleato de isoamila, correspondendo a produtividades da ordem de $1000 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{cat.min}^{-1}$.

Tabela 5.4 - Esterificação do álcool isoamílico com ácido oleico catalisada por diferentes fontes de lipases imobilizadas em STY-DVB

Fonte de lipase	Conversão molar (%)		Tempo de reação (h)	Concentração do éster (mol.L^{-1})	Produtividade em éster ($\mu\text{mol.L}^{-1}\text{.g}^{-1}\text{ cat.min}^{-1}$)
	Ácido	Álcool			
LCR	95,49±0,49	97,92±0,00	24	1,42±0,02	493,5 ±1,15
CALB L	97,96±0,05	97,67±0,48	12	1,47±0,02	1020,8 ±1,08
LRO	96,16±1,50	97,57±2,46	12	1,42±0,01	986,1±1,47
LG	98,29±0,47	96,25±0,47	12	1,44±0,01	1000,0 ±1,48
LAK	96,18±0,49	96,89±0,50	72	1,43±0,01	165,5±0,70
LTL	94,91±2,29	94,96±0,40	120	1,43±0,01	99,30±1,90

Fonte: próprio autor.

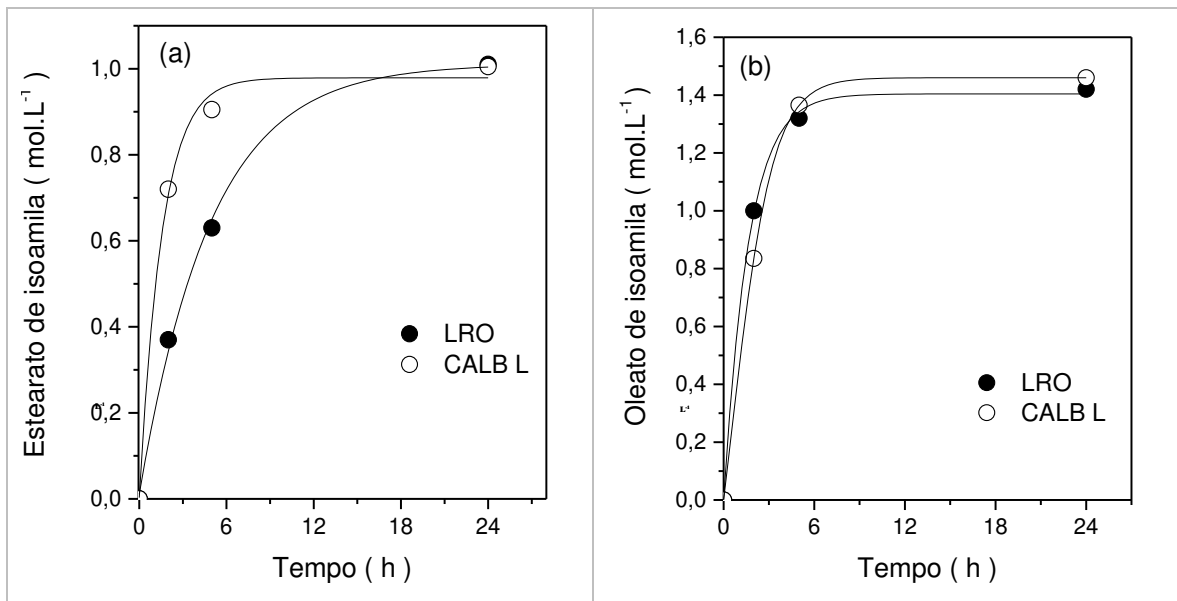
5.4 Desempenho comparativo das fontes de lipases selecionadas para mediar a síntese do estearato e oleato de isoamila

Nas seções anteriores foram efetuados testes de triagem de lipases para mediar a síntese dos ésteres estearato de isoamila e oleato de isoamila. Em ambos os sistemas reacionais as lipases de *Rhizopus oryzae* e *Candida antarctica* apresentaram o melhor conjunto de parâmetros que as destacaram em relação a terceira lipase mais efetiva (LG) para as sínteses propostas.

Conforme pode ser observado nas Figuras 5.3 (a, b), o desempenho das LRO e CALB L foram bastante similares na formação do éster estearato de isoamila (Fig. 5.3 a) e do éster oleato de isoamila (Fig. 5.3 b). Verifica-se ainda que as velocidades de reações na formação dos ésteres foram diferentes para os sistemas reacionais ensaiados para ambas as enzimas, sendo constatada maior velocidade de reação na síntese do oleato de isoamila (Figuras 5.4 a, b). Este resultado pode ser associado as diferentes propriedades dos ácidos esteárico e oleico (Tabela 5.5), sendo este comportamento também reportado na literatura, ou seja, ácidos graxos de cadeia longa saturada apresentam menor grau de esterificação (SELMI *et al.*, 1997). Entre as propriedades dos ácidos graxos saturados que merece ser citada é

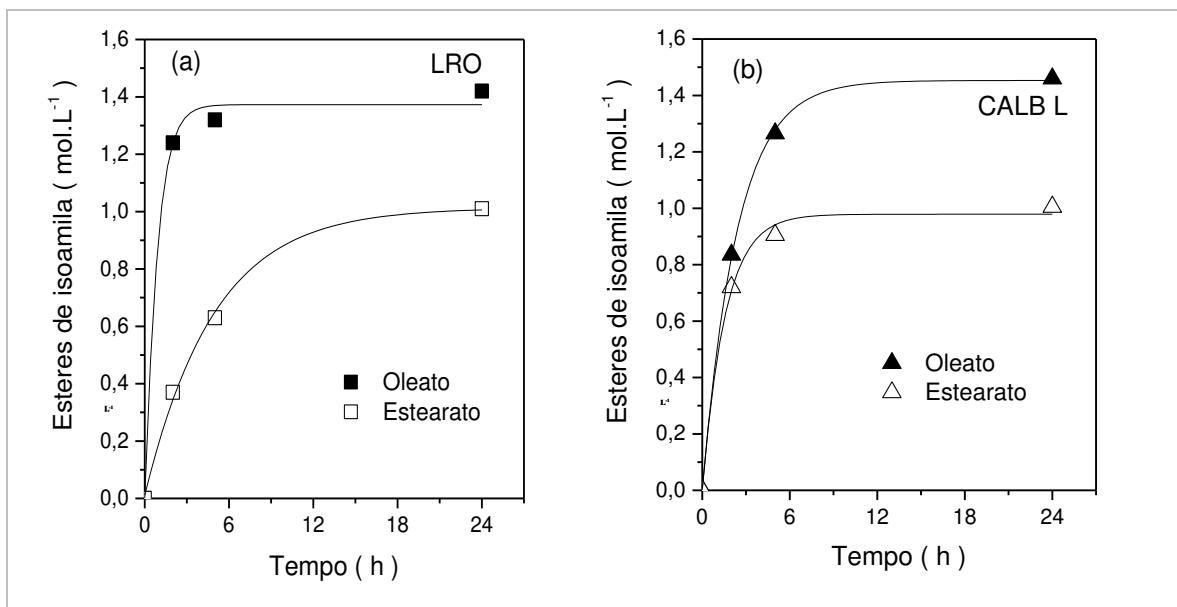
referente ao estado sólido que estes ácidos se apresentam na temperatura de reação ($< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), isto afeta diretamente a viscosidade do meio reacional dificultando a difusão requerida do ácido graxo com o álcool para formação do éster, bem como o teor de água do meio reacional (Tabela 5.6). É importante destacar que o ponto de fusão do ácido esteárico é 5 vezes maior que o do ácido oleico.

Figura 5.1 - Comparação do desempenho das lipases *Rhizopus oryzae* e *Candida antarctica* na formação dos ésteres estearato de isoamila (a) e oleato de isoamila (b)



Fonte: próprio autor.

Figura 5.2 - Formação dos ésteres estearato de isoamila e oleato de isoamila pela atuação das *Rhizopus oryzae* (a) e *Candida antarctica* (b)



Fonte: próprio autor.

Tabela 5.5 - Influência dos materiais de partida na composição dos meios reacionais usados nas reações de esterificação

Ponto de fusão dos ácidos graxos		Fonte de lipase	Umidade da lipase imobilizada (%)	Umidade (%) do substrato	
C18:0	C18:1			Ácido esteárico + álcool isoamílico	Ácido oleico + álcool isoamílico
70 °C	13° C	CALB L	6,8	0,39	0,05
		LRO	6,6	0,24	0,05

Fonte: próprio autor.

De acordo com as Figuras 5.3 e 5.4 também pode ser verificado que a lipase de *Rhizopus oryzae* foi mais suscetível aos efeitos das propriedades do ácido esteárico, que a lipase de *Candida antarctica*, sendo este fato relacionado com a composição e estrutura dos grupos funcionais das duas enzimas avaliadas. Ambas as lipases possuem o grupo hidroxila da serina e o grupo amino da histidina, como resíduos ativos, entretanto como é de conhecimento a tampa da lipase de *Candida antarctica* não interfere na sua ligação com o substrato (UPPENBERG *et al.*, 1994), enquanto a lipase de *Rhizopus oryzae* pode interferir. Para validar esse argumento, é preciso avaliar a estrutura molecular enzimática, bem como da referida molécula, por técnicas como a de difração de raios-X (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), entretanto esse tema não será investigado no presente estudo.

Em suma, a diferença no comportamento dos catalisadores frente aos mesmos substratos é consequência da especificidade inerente as enzimas, o que as tornam vantajosas em relação aos catalisadores químicos. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas possuem especificidade e são capazes de diferenciar seu comportamento frente aos substratos, de acordo com as modificações no meio reacional. Essa característica é devido a conformação do sitio ativo, bem como dos resíduos de aminoácidos que o cercam. Sabendo que estes sítios ativos possuem cargas e diferentes grupos reacionais e são suscetíveis a modificações por fatores, tais como: solvente, teor de água, temperatura e substrato, é possível prever que a seletividade e atividade das lipases sejam alteradas. A literatura recomenda que os sistemas catalisados por lipases devem ser tratados caso a caso e generalizações devem ser praticadas com cautela (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Esse fato é o que as tornam alvos de diversos estudos com o objetivo de otimizar as reações de grande interesse para a síntese de produtos específicos.

Desta forma para dar sequência ao trabalho foi proposto substituir o álcool isoamílico por óleo fúsel e testar as lipases (*Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae*) que apresentaram

desempenho destacado na síntese de estearato de isoamila e oleato de isoamila. No estabelecimento das condições operacionais de obtenção dos ésteres foi adotada a metodologia de planejamento estatístico, tendo como variáveis independentes: concentração de substrato e temperatura para cada sistema reacional.

5.5 Planejamento fatorial para determinar as condições otimizadas da síntese do esterato de isoamila catalisada pelas lipases *R.oryzae* e *C. antarctica*

Tendo selecionado os biocatalisadores mais eficientes, foram determinadas as condições otimizadas para síntese do estearato de isoamila utilizando LRO e CALB L. Para tanto, adotou-se planejamentos experimentais compostos de face centrada 2^2 , definindo como variáveis independentes a razão molar entre ácido e álcool (X_1) e a temperatura (X_2). Como variáveis resposta foram consideradas a conversão molar do álcool isoamílico e a formação do estearato de isoamila. A Tabela 5.6 mostra a matriz experimental, juntamente com os resultados obtidos pela atuação dos biocatalisadores selecionados (Apêndices D e E).

Verifica-se que a conversão do álcool isoamílico apresentou uma variação de 59,9 a 96,9 % para ambos biocatalisadores. Para a LRO o valor mais elevado de conversão molar (96,9 %) foi obtido nos ensaios 2 e 4 referentes ao substrato contendo excesso de ácido (1,25:1), independente da temperatura de incubação. Em contrapartida, os ensaios 1 e 3 realizados nos níveis mínimos de razão molar contendo excesso de álcool (0,75:1), independente da temperatura (40 e 50 °C) apresentaram o menor desempenho tanto na conversão molar do álcool isoamílico (60%) quanto na formação do estearato de isoamila (0,90 mol.L⁻¹). O melhor desempenho da LRO foi alcançado nos ensaios 9,10 e 11 utilizando razão equimolar entre o ácido esteárico e álcool isoamílico a 45 °C. Nestas condições foram obtidas conversões molares elevadas de ambos materiais de partida (93-95%) e elevada formação do éster (1,45 mol.L⁻¹). A CALB L apresentou desempenho similar a LRO em todas as condições estudadas. Os ensaios 9,10 e 11, realizado no nível central razão equimolar dos materiais de partida (1:1) e temperatura (45 °C) forneceu conversões molares mais elevadas de ambos materiais de partida (91-93%) e concentração mais elevada do estearato de isoamila (1,40 mol.L⁻¹).

Tabela 5.6 - Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento composto de face centrada 2² utilizado para otimizar a reação de esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico catalisada pelas lipases de *Rhizopus oryzae* e *Candida antarctica* imobilizadas em STY-DVB

Ensaio	Níveis reais das variáveis		Variável resposta					
	Razão molar Ácido: álcool	Temperatura (°C)	<i>Rhizopus oryzae</i>			<i>Candida antarctica</i>		
			Conversão molar (%)		Esterato de isoamila (mol.L ⁻¹)	Conversão molar (%)		Esterato de isoamila (mol.L ⁻¹)
		Ácido esteárico	Álcool Isoamílico	Ácido Esteárico		Álcool Isoamílico		
1	0,75:1 (-1)	40 (-1)	78,1 ± 2,47	59,9 ± 1,91	0,90 ± 0,05	84,8 ± 0,71	62,5 ± 1,20	0,96 ± 0,05
2	1,25: 1 (1)	40 (-1)	80,3 ± 0,21	96,5 ± 1,27	1,10 ± 0,00	77,0 ± 0,85	96,9 ± 0,71	1,11 ± 0,01
3	0,75: 1 (-1)	50 (1)	76,8 ± 0,64	61,9 ± 4,81	0,88 ± 0,02	84,8 ± 0,71	61,9 ± 0,64	0,91 ± 0,01
4	1,25: 1 (1)	50 (1)	78,2 ± 0,85	96,5 ± 1,27	1,11 ± 0,01	77,0 ± 0,85	94,8 ± 1,20	1,09 ± 0,01
5	0,75: 1 (-1)	45 (0)	76,5 ± 1,06	65,2 ± 0,14	0,90 ± 0,01	92,6 ± 0,57	70,0 ± 1,13	1,07 ± 0,02
6	1,25: 1 (1)	45 (0)	81,0 ± 0,78	96,5 ± 1,27	1,11 ± 0,01	79,5 ± 0,35	90,4 ± 1,13	1,01 ± 0,00
7	1:1 (0)	40 (-1)	88,2 ± 0,99	89,8 ± 2,76	1,30 ± 0,03	87,4 ± 1,34	91,1 ± 0,85	1,33 ± 0,01
8	1:1 (0)	50 (1)	70,9 ± 0,42	72,6 ± 0,71	1,05 ± 0,01	89,8 ± 1,06	84,9 ± 1,13	1,11 ± 0,01
9	1:1 (0)	45(0)	95,1 ± 0,42	93,5 ± 0,42	1,43 ± 0,01	92,8 ± 0,57	91,8 ± 0,07	1,38 ± 0,01
10	1:1(0)	45(0)	96,1 ± 0,92	95,6 ± 1,48	1,45 ± 0,01	93,2 ± 0,00	91,1 ± 1,06	1,39 ± 0,00
11	1:1(0)	45(0)	95,1 ± 0,42	94,2 ± 0,49	1,44 ± 0,01	93,4 ± 0,00	91,2 ± 1,10	1,44 ± 0,01

Fonte: Próprio autor.

Dados obtidos em 24 h de reação

Concentração inicial de álcool isoamílico= 1,5 mol.L⁻¹

5.5.1 Análise estatística dos resultados considerando a formação do estearato de isoamila como variável dependente

O programa Statistica 13 foi utilizado para a análise dos efeitos das variáveis independentes na formação do estearato de isoamila pela atuação das lipases *Rhizopus oryzae* e *Candida antarctica* (Tabelas 5.7 e 5.8).

Tabela 5.7 - Estimativa dos efeitos para a formação de estearato de isoamila pela atuação da LRO de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada para um nível de confiança 95%.

Variável	Efeito	Erro Padrão	Valor t	p
Média	1,3858	0,057	24,241	0,0000
(X ₁) Razão Molar	0,2133	0,091	2,3446	0,0660
(X ₁ ²) Razão Molar	-0,5989	0,140	-4,2772	0,0078
(X ₂) Temperatura	-0,0867	0,091	-0,9525	0,3845
X ₂ ²) Temperatura	-0,2589	0,140	-1,8492	0,1236
X ₁ . X ₂	0,0150	0,111	0,1346	0,8982

Fonte: Próprio autor.

*p: efeitos significativos para valores de $p < 0,05$.

Tabela 5.8 - Estimativa dos efeitos para a formação de estearato de isoamila pela atuação da CALB L de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada para um nível de confiança 95%.

Variável	Efeito	Erro Padrão	Valor t	p
Média	1,3695	0,049	27,627	0,0000
(X ₁) Razão Molar	0,0900	0,079	1,1407	0,3056
(X ₁ ²) Razão Molar	-0,5574	0,121	-4,590	0,0058
(X ₂) Temperatura	-0,0967	0,079	-1,225	0,2750
X ₂ ²) Temperatura	-0,1974	0,121	-1,625	0,1649
X ₁ . X ₂	0,0150	0,097	0,155	0,8827

Fonte: Próprio autor.

*p: efeitos significativos para valores de $p < 0,05$.

Verifica-se que a razão molar dos materiais de partida foi a variável que influenciou de maneira mais significativa nos resultados alcançados para ambos biocatalisadores. Tanto para a LRO (Tabela 5.7) como para a CALB L (Tabela 5.8) verificou-se que os efeitos significativos ocorreram para apenas para a variável quadrática X₂(Q), da ordem de -0,59 e

-0,55, respectivamente. Esses resultados demonstram efeitos estatísticos significativos e negativos, isto é, o aumento na razão molar resultará em menores concentrações do estearato de isoamila. As interações das variáveis não apresentaram efeitos significativos ao nível de 95% de confiança, o que mostra que a temperatura não exerce influência no desempenho dos biocatalisadores na faixa estudada.

Os efeitos principais para a formação do éster foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo polinomial e a melhor função ajustada é apresentada na Tabela 5.9 para cada um dos biocatalisadores, em que: Y é a variável resposta (concentração de éster em mol.L⁻¹) e X₁ e X₂, representam os valores codificados para razão molar e temperatura, respectivamente. Visando avaliar a adequação dos modelos aos resultados experimentais obtidos realizou-se análise de variância (ANOVA), as quais se encontram apresentadas nas Tabelas 5.10 e 5.11.

Tabela 5.9 - Modelos matemáticos para a variável concentração de estearato de isoamila (Y) em função da razão molar (X₁) e Temperatura (X₂).

Biocatalisador	Modelo matemático	R²
<i>Rhizopus oryzae</i>	$Y=1,38+0,107*X_1-0,299*X_1^2-0,043*X_2-0,129*X_2^2+0,007*X_1*X_2$	0,8729
<i>Candida antarctica</i>	$Y=1,369+0,045*X_1-0,279*X_1^2-0,0483*X_2-0,099*X_2^2+0,007*X_1*X_2$	0,8671

Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.10 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de éster pela atuação da LRO

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F_{cal}	p<0,05
X ₁	0,0682	1	0,068267	5,49702	0,0664
X ₁ ²	0,2272	1	0,227201	18,29481	0,0078
X ₂	0,0113	1	0,011267	0,90722	0,3846
X ₂ ²	0,0424	1	0,042467	3,41959	0,1237
X ₁ X ₂	0,0002	1	0,000225	0,01812	0,8982
Erro puro	0,0620	5	0,012419		
Total	0,4885	10			

Fonte: Próprio autor.

F: teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Tabela 5.11 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de éster pela atuação da CALB L

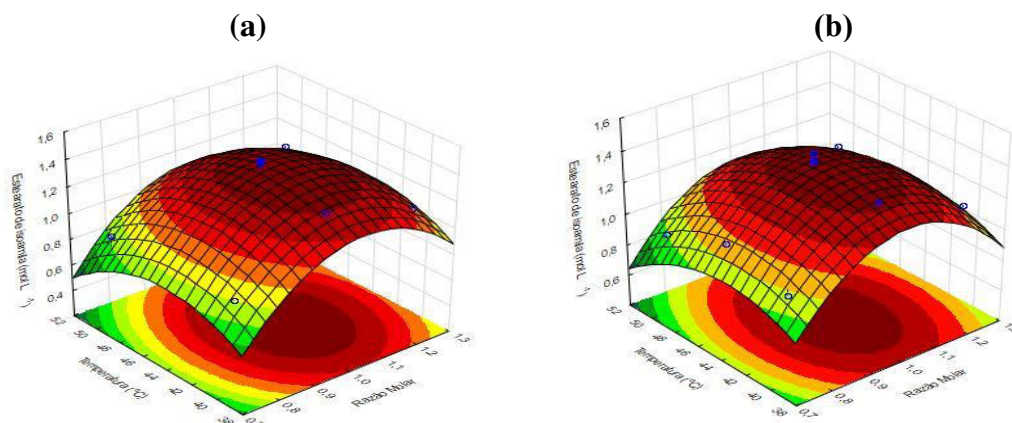
Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,05
X ₁	0,0121	1	0,012150	1,3012	0,30566
X ₁ ²	0,1967	1	0,196751	21,0712	0,005892
X ₂	0,0140	1	0,014017	1,5011	0,275061
X ₂ ²	0,0246	1	0,024671	2,6422	0,164990
X ₁ X ₂	0,0002	1	0,000225	0,0241	0,882712
Erro puro	0,0466	5	0,009337		
Total	0,3514	10			

Fonte: Próprio autor.

F: teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo. *Significativo ao nível de significância de 95% (p<0,05).

Com os modelos validados, foi possível gerar os gráficos de superfícies de resposta conforme mostrado nas Figuras 5.5(a, b). Os gráficos de superfície de resposta demonstraram que para se obter concentração máxima de éster (>1,2 mol.L⁻¹), o valor ótimo para razão é a equimolar (1:1). A variável temperatura não apresentou efeito significativo sobre a formação do éster, sendo possível obter elevada concentração de estearato de isoamila em toda faixa de temperatura estudada (40 a 50 °C).

Figuras 5.5(a, b) - Superfície de resposta para os efeitos das variáveis razão molar ácido/álcool e temperatura para formação do estearato de isoamila pela ação da LRO (a) e CALB L (b)



Fonte: próprio autor.

5.6 Planejamento fatorial para determinar as condições otimizadas da síntese do oleato de isoamila pela atuação das lipases *R. oryzae* e *Candida antarctica*

Na Tabela 5.12 são apresentados os valores obtidos (24 h de reação) referentes aos teores de oleato de isoamila, bem como da conversão molar dos materiais de partida, para as diversas condições testadas nas reações catalisadas pela LRO e CALB L (Apêndices F e G).

Dos 22 resultados obtidos, 45% dos maiores valores de conversão são referentes a atuação da CALB L, 18% à atuação da LRO e 37% representaram valores semelhantes para os dois biocatalisadores. É importante ressaltar que a quantidade de enzima em cada reação foi calculada em termos de unidades de atividade/ volume de substrato. Desta forma, foi possível verificar a influência da especificidade de cada biocatalisador sem interferência da atividade sintética de cada lipase. Essa metodologia também evitou problemas de transferência de massa em função de grande aglomerado de enzima o que poderia dificultar o acesso do substrato ao sítio ativo das lipases.

De uma forma geral, os resultados indicam que ambos biocatalisadores foram capazes de formar oleato de isoamila em todas as condições ensaiadas. No caso dos ensaios conduzidos com LRO verifica-se que apenas a temperatura influenciou de maneira significativa nos resultados alcançados. Os valores mais elevados de concentração de éster foram obtidos a 45 °C, independente da razão molar do substrato. O melhor desempenho da LRO foi alcançado nos ensaios 9,10 e 11 utilizando proporção equimolar entre o ácido oleico e álcool isoamílico a 45 °C. Nestas condições foram obtidas conversões molares elevadas de ambos materiais de partida (93-95%) e elevada formação do éster (1,45 mol.L⁻¹).

Para os ensaios conduzidos pela CALB L, verifica-se que a razão molar dos materiais de partida foi a variável que influenciou de maneira mais significativa nos resultados alcançados. Desta forma, para substratos contendo excesso de ácido oleico (ensaios 2, 4, 6) foram obtidas conversões molares superiores a 80%, independente da temperatura de incubação utilizada. As reações conduzidas com substratos contendo proporções equimolares dos materiais de partida (ensaios 7 a 11) forneceram elevadas conversões molares (>90%) e concentrações de éster superior 1,22 mol.L⁻¹. Nas reações conduzidas com substratos contendo excesso de óleo fusel (ensaios 1, 3 e 5) foram obtidos os menores valores de conversão molar refletindo na redução do teor de éster (< 1,0 mol.L⁻¹). Os dados obtidos indicam, de maneira geral, que razão equimolar favorece a reação na direção desejada (esterificação), favorecendo o aumento da concentração de éster.

Tabela 5.12 - Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento composto de face centrada 2^2 utilizado para otimizar a reação de esterificação do óleo fusel com ácido oleico catalisada pelas lipases de *Rhizopus oryzae* e *Candida antarctica* imobilizadas em STY-DVB

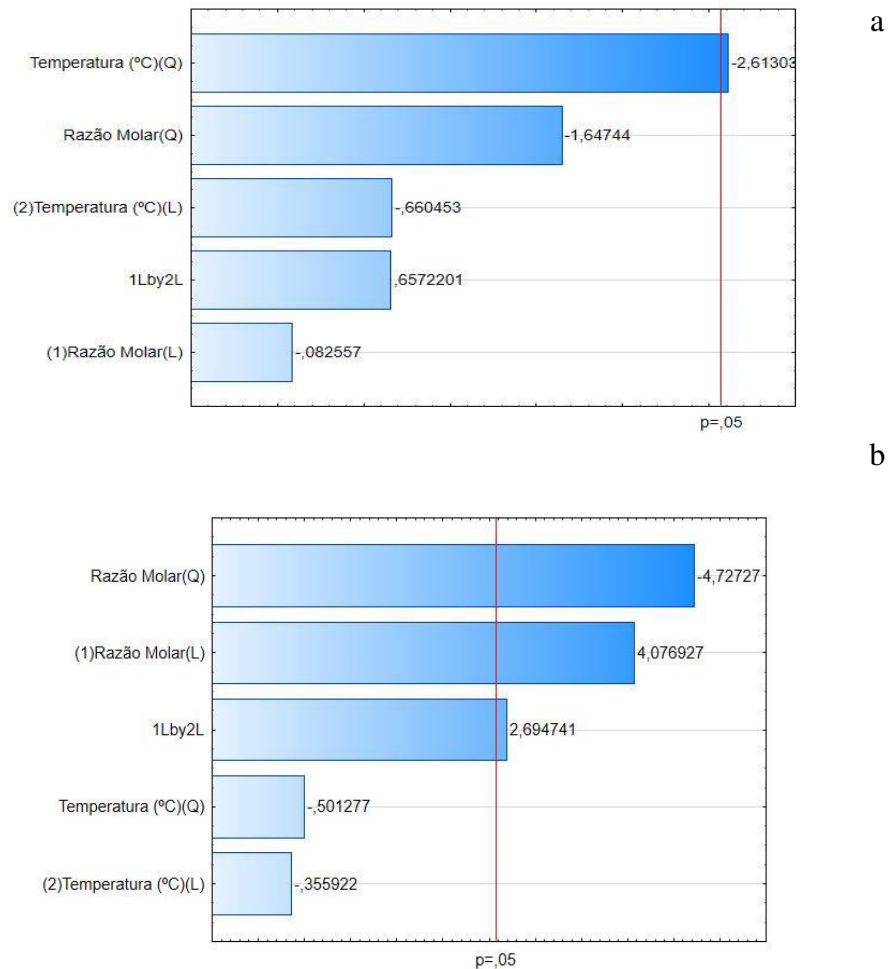
Ensaio	Níveis reais das variáveis		<i>Rhizopus oryzae</i>			<i>Candida antarctica</i>		
	Razão molar Ácido: álcool	Temperatura (°C)	Conversão molar (%)		Oleato de isoamila (mol.L ⁻¹)	Conversão molar (%)		Oleato de isoamila (mol.L ⁻¹)
			Ácido Oleico	Álcool Isoamílico		Ácido Oleico	Álcool Isoamílico	
1	0,75:1 (-1)	40 (-1)	92,7 ± 0,71	73,0 ± 2,83	1,07 ± 0,01	94,9 ± 0,00	74,9 ± 0,21	1,00 ± 0,00
2	1,25: 1 (1)	40 (-1)	69,9 ± 0,99	67,3 ± 3,32	0,98 ± 0,01	79,1 ± 1,48	97,3 ± 0,99	1,16 ± 0,00
3	0,75: 1 (-1)	50 (1)	75,9 ± 1,77	49,2 ± 2,12	0,72 ± 0,02	50,5 ± 1,20	44,5 ± 0,28	0,55 ± 0,01
4	1,25: 1 (1)	50 (1)	55,5 ± 0,92	59,2 ± 2,12	0,89 ± 0,01	84,6 ± 0,21	96,6 ± 0,99	1,39 ± 0,01
5	0,75: 1 (-1)	45 (0)	90,6 ± 0,14	71,4 ± 3,75	1,07 ± 0,01	77,8 ± 0,28	62,6 ± 0,57	0,81 ± 0,01
6	1,25: 1 (1)	45 (0)	70,9 ± 0,14	63,3 ± 0,71	0,95 ± 0,00	83,4 ± 0,00	76,0 ± 1,41	1,07 ± 0,04
7	1:1 (0)	40 (-1)	70,7 ± 0,00	54,2 ± 0,28	0,83 ± 0,00	86,0 ± 0,07	82,7 ± 0,92	1,22 ± 0,00
8	1:1 (0)	50 (1)	62,6 ± 0,21	85,9 ± 1,13	0,95 ± 0,00	85,9 ± 0,00	89,0 ± 1,48	1,33 ± 0,01
9	1:1 (0)	45(0)	96,0 ± 0,00	99,3 ± 0,00	1,47 ± 0,00	96,7 ± 0,07	98,0 ± 0,00	1,44 ± 0,00
10	1:1(0)	45(0)	95,4 ± 0,07	98,4 ± 0,49	1,47 ± 0,01	96,0 ± 0,00	97,0 ± 0,42	1,45 ± 0,01
11	1:1(0)	45(0)	95,4 ± 0,07	95,7 ± 0,49	1,47 ± 0,00	96,7 ± 0,00	97,7 ± 0,49	1,47 ± 0,01

Fonte: Próprio autor.

5.6.1 Análise estatística dos resultados considerando a concentração do oleato de isoamila formado pela atuação das lipases R. oryzae e C. antarctica como variável dependente

Para a análise dos efeitos das variáveis independentes na concentração de oleato de isoamila foi utilizado o programa STATISTICA 12.5. Os dados obtidos estão apresentados na forma de gráfico de Pareto, conforme mostrado nas Figuras 5.6. O gráfico apresenta a análise estatística dos efeitos padronizados (t calculado em relação a t tabelado, com 95% de confiança) relacionados a variável resposta concentração de oleato de isoamila

Figura 5.6 - Efeitos das variáveis independentes estudadas, X_1 = razão molar e X_2 = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e suas interações sobre a concentração de oleato de isoamila pela atuação da LRO (a) e CALB L (b) para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$)



Fonte: Próprio autor.

Os dados obtidos pela atuação da LRO geraram o gráfico Pareto (Figura 5.6 a) que indicou apenas a variável quadrática (X_1^2) temperatura estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95%, enquanto a variável razão molar não foi significativa.

Por outro lado, os resultados referentes atuação da CALB L e de acordo com a Figura 5.6b, verifica-se que a razão molar quadrática (X_1^2) foi a variável mais significativa na conversão do ácido oleico a oleato de isoamila (efeito - 4,72), seguido da razão molar (efeito 4,07) e interação entre razão molar e temperatura (efeito + 2,69).

Os efeitos principais para a formação do éster foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo polinomial e a melhor função ajustada é apresentada na Tabela 5.13 para cada um dos biocatalisadores, em que: Y é a variável resposta (concentração de éster em mol.L⁻¹) e X_1 e X_2 , representam os valores codificados para razão molar e temperatura, respectivamente.

Tabela 5.13 - Modelos matemáticos para a variável concentração de oleato de isoamila (Y) em função da razão molar (X_1) e Temperatura (X_2).

Biocatalisador	Modelo matemático	R²
<i>Rhizopus oryzae</i>	$Y=1,368-0,007*X_1-0,205*X_1^2-0,053*X_2-$ $0,325*X_2^2+0,065*X_1*X_2$	0,7315
<i>Candida antarctica</i>	$Y=1,398+0,21*X_1-0,375*X_1^2-0,018*X_2-$ $0,040*X_2^2+0,17*X_1*X_2$	0,9086

Fonte: Próprio autor.

Visando avaliar a adequação dos modelos aos resultados experimentais obtidos realizou-se análise de variância (ANOVA), as quais se encontram apresentadas nas Tabelas 5.14 e 5.15.

Com os modelos validados, foi possível gerar os gráficos de superfície de resposta (Figura 5.7 a, b), mostrando a interação entre os fatores razão molar de ácido/álcool e temperatura e sua influência na variável resposta.

Com base nos resultados, observa-se uma tendência experimental e um comportamento definido, demonstrando em termos gerais que, independente da temperatura adotada nível central da razão molar favorece a formação de elevadas concentrações do oleato de isoamila.

Tabela 5.14 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de oleato de isoamila pela atuação da LRO

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,05
X ₁	0,0002	1	0,0002	0,0068	0,9374
X ₁ ²	0,1061	1	0,1062	2,7140	0,1603
X ₂	0,0170	1	0,0170	0,4362	0,5381
X ₂ ²	0,2671	1	0,2672	6,8279	0,0474
X ₁ X ₂	0,0169	1	0,0169	0,4319	0,5400
Erro puro	0,1956	5	0,0391		
Total	0,7284	10			

Fonte: Próprio autor.

F: teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Tabela 5.15 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta formação de oleato de isoamila pela atuação da CALB L

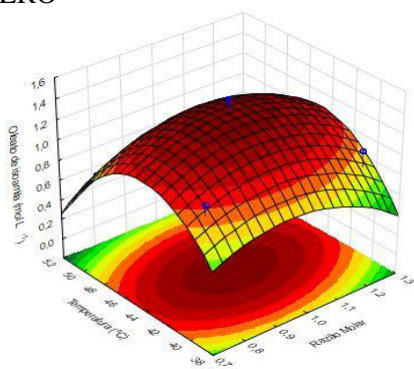
Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,05
X ₁	0,2646	1	0,2646	16,6213	0,0095
X ₁ ²	0,3557	1	0,3557	22,3471	0,0052
X ₂	0,0020	1	0,0020	0,1266	0,7364
X ₂ ²	0,0040	1	0,0040	0,2512	0,6374
X ₁ X ₂	0,1156	1	0,1156	7,2616	0,0430
Erro puro	0,0795	5	0,0159		
Total	0,8707	10			

Fonte: Próprio autor.

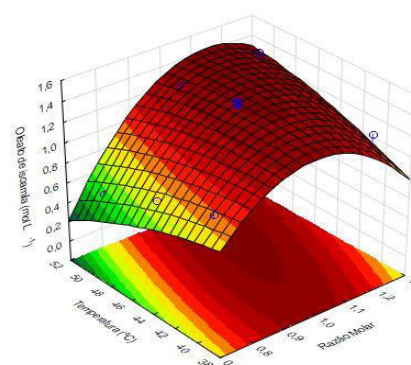
F: teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Figura 5.7 - Superfície de resposta para os efeitos das variáveis razão molar ácido/álcool e temperatura para formação do oleato de isoamila pela atuação da LRO (a) e CALB L (b)

(a)-LRO



(b) CALB L



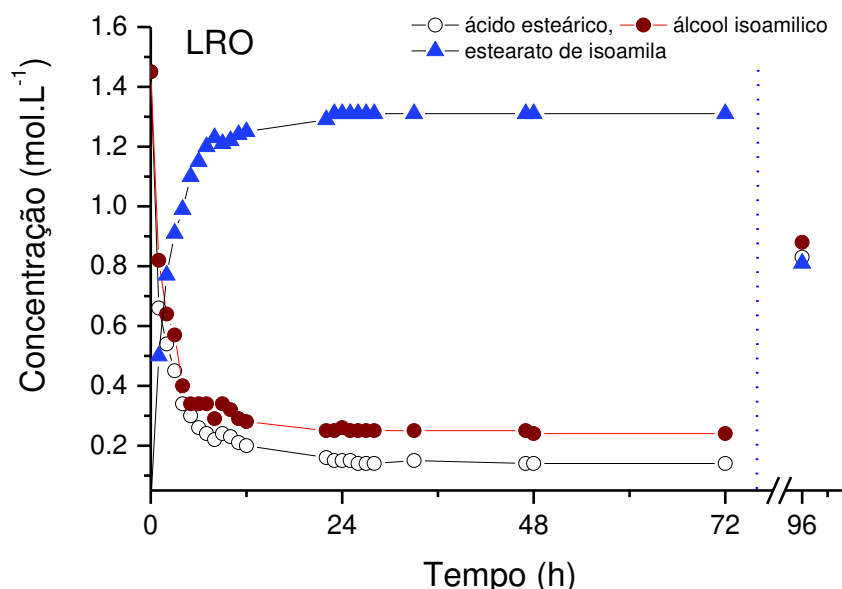
Fonte: próprio autor

5.7 Síntese de estearato de isoamila catalisada pelas lipases *R. oryzae* e *C. antarctica* conduzida em reator de leito fixo em regime contínuo

Utilizando a lipase de *R. oryzae* imobilizada em STY-DVB com atividade hidrolítica de 3390 U.g⁻¹, o reator de leito fixo foi carregado numa proporção de 80% do leito catalítico. Os experimentos foram realizados a 45 °C com fluxo de 0,8 mL.h⁻¹ correspondendo a um tempo espacial de 7,2 h (Apêndice H).

Os resultados apresentados na Figura 5.8 indicam que o estado estacionário foi atingido em 12 h e esta condição foi mantida por pelo menos 72 h (10 tempos espaciais). Durante este período, foi detectado consumo dos materiais de partida da ordem de 90% com conseqüente formação de 1,31 mol.L⁻¹ de estearato de isoamila, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 3144±15 mmol.g⁻¹.min⁻¹.

Figura 5.8 - Perfil da formação do estearato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico por lipase *Rhizopus oryzae* imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (tempo espacial= 7,2 h; carga de biocatalisador =3,0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C na presença de solvente)

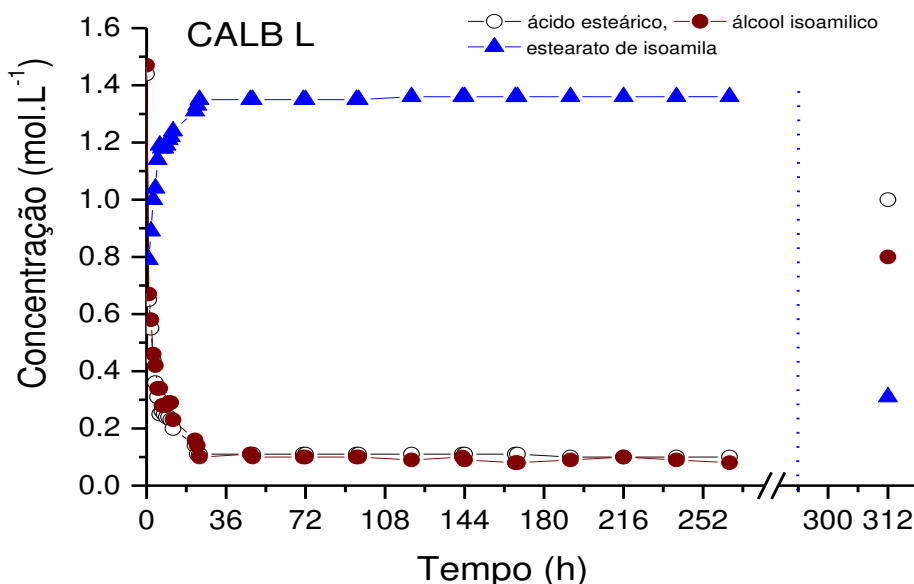


Fonte: Próprio autor.

Utilizando a lipase de *C.antarctica* imobilizada em STY-DVB com atividade hidrolítica de 266,2 U.g⁻¹, o reator de leito fixo foi carregado numa proporção de 80% do leito catalítico. Os experimentos foram realizados a 45 °C com fluxo de 1,0 mL.h⁻¹ correspondendo a um tempo espacial de 5,6 h (Apêndice I).

Os resultados exibidos na Figura 5.9 indicam que a CALB L proporcionou melhor desempenho do sistema operacional, permitindo que o estado estacionário fosse alcançado em 9 horas (2 tempos espaciais) atingindo em média de 1,28 mol.L⁻¹ de estearato de isoamila, refletindo no alto consumo dos materiais de partida (>93%). Observou-se também que não houve diferenças significativas na formação de estearato de isoamila durante todo o processo operando de forma contínua (264 h), revelando produtividade média de 2539±10 mmol.g⁻¹.min⁻¹ (Apêndice I).

Figura 5.9 - Perfil da formação do estearato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico por lipase de *C. antarctica* imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (tempo espacial= 5,6 h; carga de biocatalisador =3,0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C na presença de solvente)



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 5.16 compara o desempenho das reações de esterificação realizadas com as lipases imobilizadas em STY-DVB. Para ambos os experimentos, o estado estacionário foi obtido com menos de 3 tempos espaciais, e o melhor desempenho do reator foi constatado no sistema operando com a lipase CALB L.

Tabela 5.16 - Comparação do desempenho das diferentes lipases imobilizada em STY-DVB na esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico conduzida em reator de leito fixo em fluxo contínuo, na presença de iso-octano em 45 °C.

Parâmetros	LRO	CALB L
Atividade catalítica (U.g ⁻¹)	3390	266
Taxa de fluxo (mL.h ⁻¹)	0,80	1,0
Tempo espacial (h)	7,2	5,6
Concentração de isoamílico (mol.L ⁻¹)	1,53	1,47
Ácido esteárico (mol.L ⁻¹)	1,45	1,44
Concentração de água % (inicial)	0,30	0,25
Concentração de água % (final)	0,46	0,58
Conversão molar (%)	90	>93
Concentração do produto (mol.L ⁻¹)	1,39	1,36
Produtividade (mmol.g ⁻¹ .min ⁻¹)	3144	2539
Manutenção do estado estacionário (h)	72	240

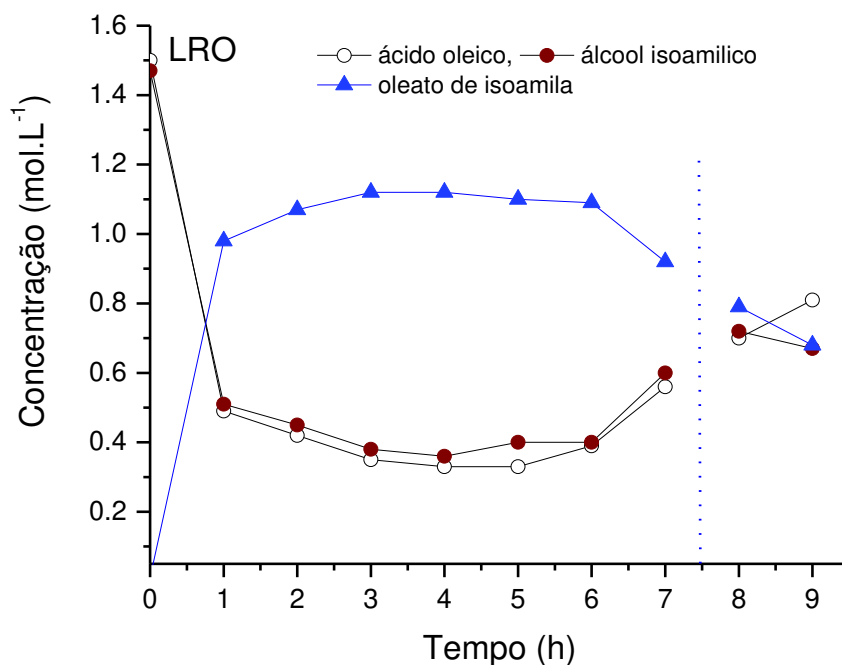
Fonte: Próprio autor.

5.8 Síntese de oleato de isoamila catalisada pelas lipases *R. oryzae* e *C.antarctica* imobilizada em STY-DVB conduzida em reator de leito fixo em regime contínuo

Utilizando a lipase de *R. oryzae* imobilizada em STY-DVB com atividade hidrolítica de 3280 U.g⁻¹, o reator de leito fixo foi carregado numa proporção de 80% do leito catalítico. Os experimentos foram realizados a 45 °C com fluxo de 0,80 mL.h⁻¹ correspondendo a um tempo espacial de 7,2 h (Apêndice J).

Os resultados apresentados na Figura 5.10 indicam que o estado estacionário foi atingido em 2 h e esta condição foi mantida por pelo menos 4 h (<1 tempo espacial). Durante este período, foi detectado consumo dos materiais de partida da ordem de 86% com conseqüente formação de 1,14 mol.L⁻¹ de oleato de isoamila, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 2774 mmol.g⁻¹.min⁻¹.

Figura 5.10 – Perfil da formação do oleato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico pela ROL imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (reação controle, tempo espacial= 7,2 h; carga de biocatalisador =3.0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C na presença de solvente)

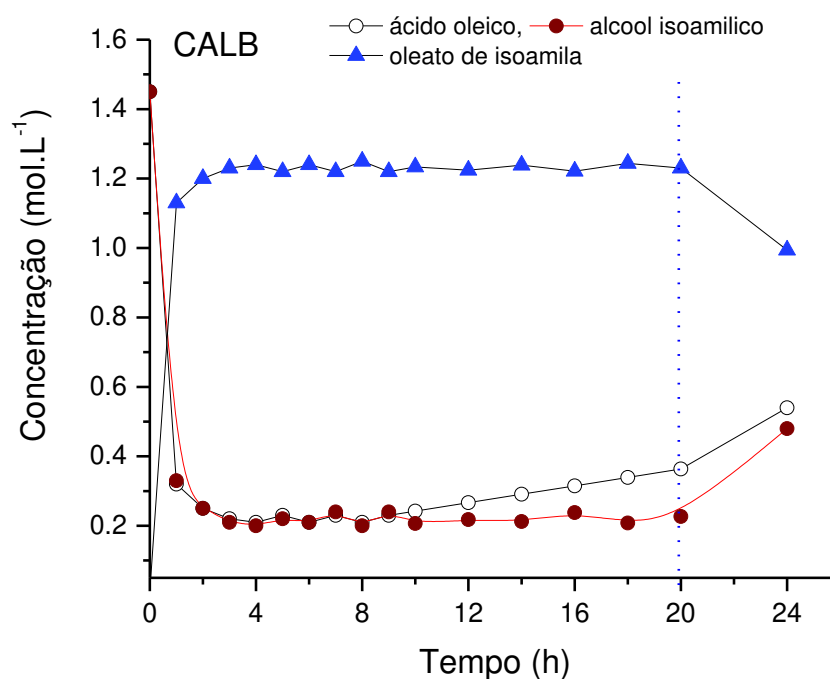


Fonte: Próprio autor.

Utilizando a lipase de *C.antarctica* imobilizada em STY-DVB com atividade hidrolítica de 266,2 U.g⁻¹, o reator de leito fixo foi carregado numa proporção de 80% do leito catalítico. Os experimentos foram realizados a 45 °C com fluxo de 0,84 mL.h⁻¹ correspondendo a um tempo espacial de 6,8 h (Apêndice L).

Os resultados apresentados na Figura 5.11 indicam que o estado estacionário foi atingido em 2 h e esta condição foi mantida por pelo menos 20 h (3 tempos espaciais). Durante este período, foi detectado consumo dos materiais de partida da ordem de 70% com conseqüente formação de 1,25 mol.L⁻¹ de oleato de isoamila, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 2833 mmol.g⁻¹.min⁻¹.

Figura 5.11 – Perfil da formação do oleato de isoamila e consumo dos materiais de partida na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico pela CALB L imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (tempo espacial= 6,8 h; carga de biocatalisador =3.0 g; razão equimolar e temperatura de 45 °C, na presença de solvente)



Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.17 - Comparação do desempenho das diferentes lipases imobilizada em STY-DVB na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico conduzida em reator de leito fixo em fluxo contínuo, na presença de iso-octano em 45 °C.

Parâmetros	LRO	CALB L
Atividade catalítica (U.g ⁻¹)	3280	266
Taxa de fluxo (mL.h ⁻¹)	0,80	0,84
Tempo espacial (h)	7,2	6,8
Concentração de isoamílico (mol.L ⁻¹)	1,47	1,45
Ácido oleico (mol.L ⁻¹)	1,50	1,45
Concentração de água % (inicial)	0,17	0,15
Concentração de água % (final)	0,20	0,25
Conversão molar (%)	77	86
Concentração do produto (mol.L ⁻¹)	1,14	1,25
Produtividade (mmol.g ⁻¹ .min ⁻¹)	2774	2833
Estabilidade do sistema (h)	7	20

Fonte: Próprio autor.

5.9 Propriedades dos ésteres obtidos

Os produtos obtidos eram compostos por ésteres derivados da reação enzimática da fração de óleo fúsel e os ácidos esteárico ou oleico, bem como os materiais de partida residuais. Para obter os ésteres puros, as misturas foram tratadas como descrito no item 4.8 e analisadas quanto a acidez, viscosidade cinemática, densidade e teor de água como apresentado na Tabela 5.18.

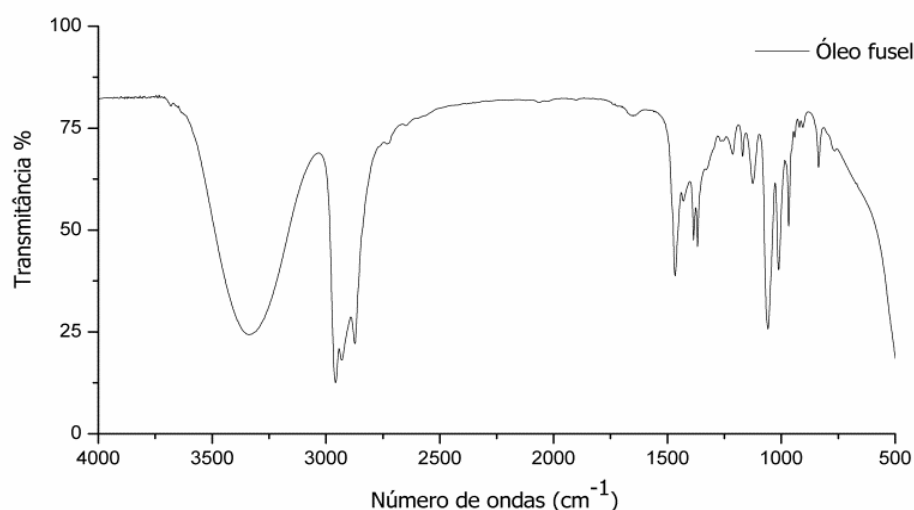
Tabela 5.18 - Propriedades dos ésteres formados

	Esterato de isoamila	Oleato de isoamila
Acidez (mol.L ⁻¹)	0,10	0,21
Viscosidade cinemática (cm ² .s ⁻¹)	9,12	6,95
Densidade (kg.cm ⁻³)	854,3	820,6
Teor de água (%)	0,07	0,06

Fonte: Próprio autor.

A análise de espectroscopia FT-IR, foi usada para identificar as funções orgânicas do óleo fúsel (Figura 5.12) e dos ésteres estearato de isoamila (Figura 5.13) e oleato de isoamila (Figura 5.14).

Figuras 5.12 - Espectro de FT-IR da amostra de óleo fúsel

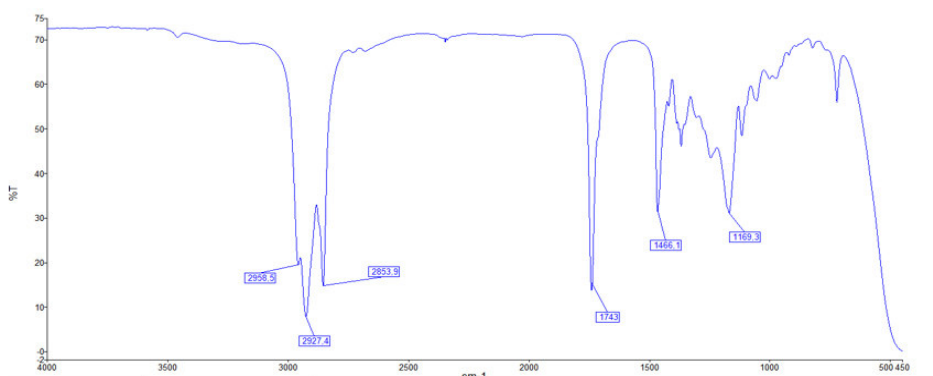


Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Figura 5.12, o óleo fúsel apresenta uma banda intensa a 3320 cm^{-1} que é atribuída ao grupo -OH, confirmando a presença de álcoois. As bandas entre 2955 e 2871 cm^{-1} correspondem à vibração de alongamento simétrico e assimétrico dos grupos C-H metil e metileno e a banda em 1055 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento de ligação simples C-O de um álcool primário.

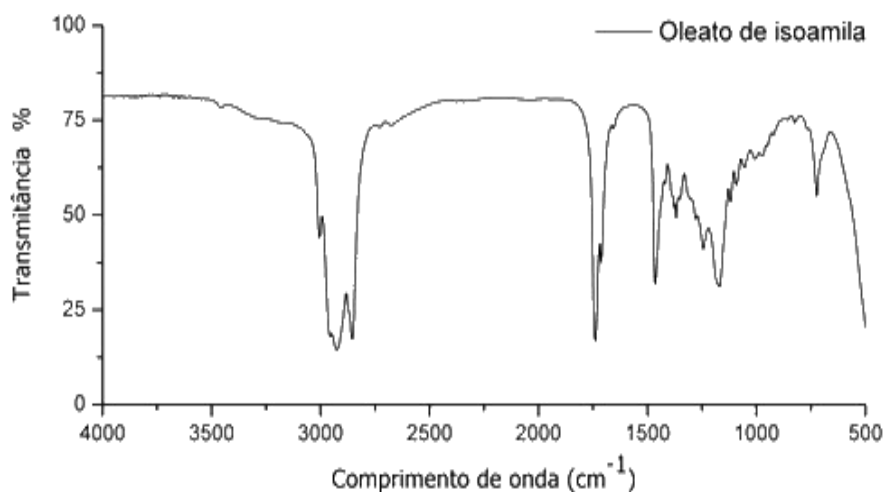
Em ambos espectros (Figuras 5.13 e 5.14) a banda intensa em 1737 cm^{-1} corresponde ao grupo carbonila do éster formado após a reação de esterificação e as bandas em 1244 e 1167 cm^{-1} ao alongamento vibracional do grupo -C(=O)O- (LAGE *et al.*, 2018), confirmando assim a síntese dos ésteres de isoamila.

Figuras 5.13 - Espectro de FT-IR da amostra do éster estearato de isoamila



Fonte: Próprio autor.

Figuras 5.14 - Espectro de FT-IR da amostra do éster oleato de isoamila

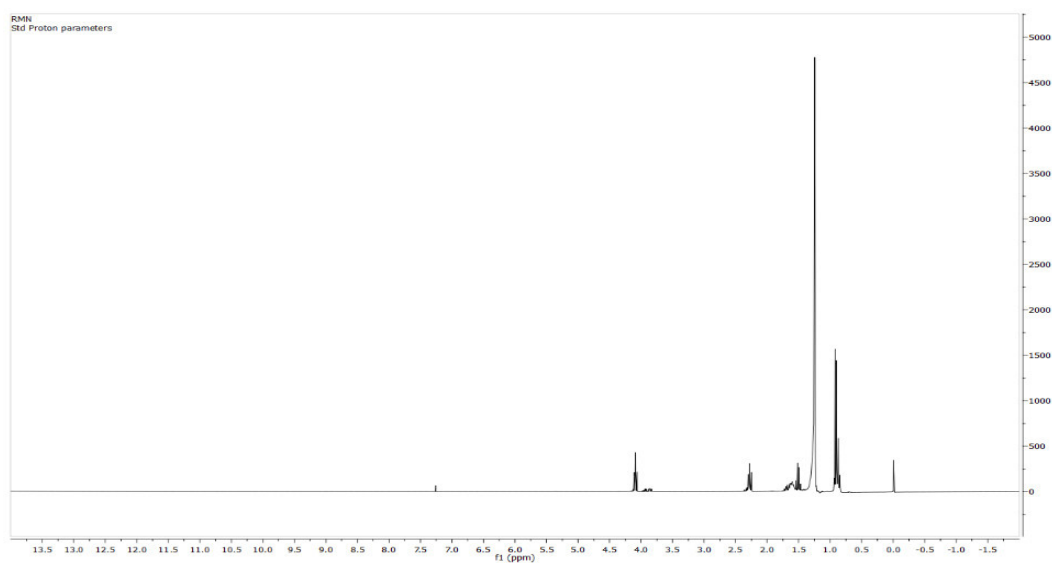


Fonte: Próprio autor.

A síntese dos ésteres também foi confirmada por análise de RMN¹³C e RMN¹H, como mostrado nas Figuras 5.15 (a,b) e 5.16 (a,b). De acordo com o espectro de RMN¹³C do éster estearato de isoamila (Figura 5.15a) e oleato de isoamila (Figura 5.16 a), o pico de 174,00 ppm corresponde ao grupo carbonil [-CH₂ (C = O) OCH₂-] da estrutura do éster.

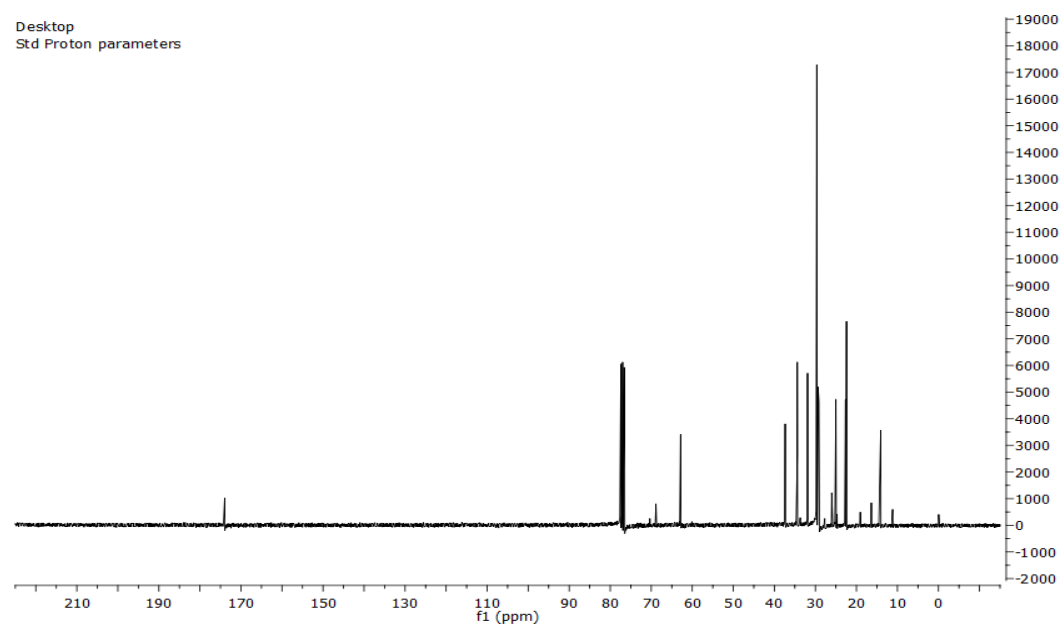
Figura 5.15 (a,b) - Espectros de RMN¹³C e RMN¹H da amostra purificada de estearato de isoamila.

5.15a



Fonte: Próprio autor.

5.15b



Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como enfoque sintetizar ésteres a partir da matéria-prima residual óleo fúsel utilizando lipases como catalisadores e diferentes doadores do grupo acila (ácidos graxos de cadeia longa C18:0 e C18:1). Mediante testes de seleção de lipases microbianas, foram selecionadas as lipases *Rhizopus oryzae* e *Candida antarctica* com potencial para aplicação na síntese dos ésteres: estearato de isoamila e oleato de isoamila.

O estabelecimento das condições operacionais de obtenção dos ésteres: estearato de isoamila e oleato de isoamila utilizando as lipases selecionadas foi efetuada por planejamento estatístico, considerando como variáveis independentes razão molar dos materiais de partida e temperatura. A análise dos resultados revelou que a formação dos ésteres foi influenciada apenas pela variável razão molar ao nível de 95% de confiança. Ambas lipases testadas tiveram comportamento bastante similar e os modelos matemáticos propostos permitiram prever as condições que favorecem o alcance de elevados rendimentos de formação dos ésteres, sendo a reação maximizada (95% em 24h) para meios reacionais constituídos de óleo fúsel e ácidos graxos numa razão molar de 1:1 e temperatura de incubação de 45 °C, independente das lipases testadas.

Na condução do processo contínuo para obtenção dos ésteres de estearato de isoamila e oleato de isoamila a fonte de lipase e os materiais de partida tiveram efeito marcante no desempenho do reator, sendo constatado estabilidade operacional apenas para o sistema ácido esteárico e óleo fusel, empregando como biocatalisador a lipase de *C. antarctica*. Para os outros sistemas reacionais, os resultados indicaram que a eficiência da produção dos ésteres foi fortemente afetada pelo acúmulo de água formada no leito catalítico resultando na inversão da reação no sentido da hidrólise.

Verifica-se ainda a potencialidade do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres lubrificantes fornecendo resultados equivalentes aos obtidos com o álcool isoamílico sintético, com propriedades físico-químicas similares aos ésteres comercialmente disponíveis.

Nas condições otimizadas, o aproveitamento do óleo fúsel não somente retirou um composto indesejado do meio ambiente, mas também permitiu a geração de produtos de interesse industrial, constituindo-se, assim, em um forte apelo ambiental.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função do desempenho insatisfatório verificado na catálise do oleato de isoamila em regime contínuo, as seguintes etapas para desenvolvimento futuro são sugeridas:

- ✓ Utilizar somente a *Candida antarctica* em processo contínuo conduzido em reator de leito fixo duplo estágio incorporando uma coluna de desidratação
- ✓ Investigar a potencialidade de se obter o éster oleato de isoamila a partir de rotas enzimáticas que não envolvem a formação de água, tais como transesterificação de óleos vegetais ricos em ácido oleico.

REFERÊNCIAS

- AIRES-BARROS, M.R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, 2002. Disponível em: <http://www.dequim.inst.utl.pt/BBio>. Acesso em: 25 set. 2020.
- AALAM, C. S.; SARAVANAN, C. Biodiesel production techniques: A review. **International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology**, v.3, n. 6, p. 41–45, 2015.
- ANOBOM, C.D.; PINHEIRO, A.S.; DE-ANDRADE, R.A.; AGUIEIRAS, E.C.; ANDRADE, G. C.; MOURA, M.V.; FREIRE, D.M. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. **BioMed Research International**, v.2014, 2014.
- ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B.D.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.; BURKERT, J.F. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2148-2156, 2011.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M.B.; THUM, O. Immobilized lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v.42, n.15, p.6475-6490, 2013.
- AZANIA, C.A.M.; AZANIA, A.A.P.M.; ROLI, J.C.; SCHIAVETTO, A.R.; PIZZO, I.V.; ZERA, F.S. Aplicação de óleo fúsel na erradicação química da cana-de-açúcar e seu efeito na cultura do girassol em sucessão. **Bragantia**, v.69, n.3, p.581-590, 2010.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.
- BIROLI, W. G.; FERREIRA, I.M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D.D.A.; MATOS, I.L.; COMASSETO, J.V.; PORTO, A.L. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v.33, n.5, p.481-510, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.
- CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v.33, p.1443-1454, 2015.
- CIPOLATTI, E. P.; MANOEL, E.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D.M.G. Support engineering relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1., p. 26-34, 2017.
- DAIHA, K.G.; ANGELI, R.; OLIVEIRA, S.D.; ALMEIDA, R.V. Are lipases still important biocatalysts? a study of scientific publications and patents for technological forecasting. **PloS one**, v.10, n.6, p.e0131624, 2015.
- DE CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A.; LEGGE, R.L.; MOO-YOUNG, M. Process development for the production of terpene esters using immobilized lipase in organic media. **Indian Journal of Chemistry-Section A**, v.31, p.891-895, 1992.

DE CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554, 1995.

DE CASTRO, H.F.; MORIYA, R.Y.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F. Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77/79, n.1, p.826-827, 1999.

DE CASTRO, H.F.; MORIYA, R.Y.; RIBEIRO, R.R. Biotransformação de óleo fúsel em ésteres aromatizantes: influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo. In: **SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE CATÁLISE**, v.17, 2000, Porto: FEUP Edições, 2000. v.1, p.793-794.

DE CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

DE CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 224-228, 1997.

DE CASTRO, H.F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; PEREIRA, P.S. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap.6, p.123-147, 2008.

DHAKE, K.P., THAKARE, D.D., BHANAGE, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v.28, p.71-83, 2013.

DORMO, N.; BELAFI-BAKO, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 229, 2004.

EDITORA STILO. O aumento dos Biolubrificantes. Ed.07/2017. Disponível em: <https://www.editorastilo.com.br/o-aumento-dos-biolubrificantes>. Acesso em: 25 set. 2020.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin, Heidelberg. Springer, 2011. p. 454.

FABRICANTE PRODUCT DIAION HP20. Mitsubishi Chemical Corporation. Disponível em: <https://www.diaion.com/en>. Acesso em: 29 set.2020.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

FERREIRA, M.C.; MEIRELLES, A.J.A.; BATISTA, E.A.C. Study of the fusel oil distillation process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.52, n.6, p.2336-2351, 2013.

FREITAS, L.; SILVA, G.S.; SANTOS, J.C.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **European Food Research & Technology**, v.233, p.743-750, 2011.

GOYAN, R.L.; MELLEY, R.E.; WISSNER, P.A.; ONG, W.C. Biodegradable lubricants. **Lubrication Engineering**, v. 54, p.7-10, 1998.

GUVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; AYDOGAN, O.; MEHMETOGLU, U. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 778-785, 2007.

HALLING, P.J. Solvent selection for biocatalysis in mainly organic system: predictions of effects on equilibrium position. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, n.7, p. 691-701, 1990.

HONARY L.A.T. Biolubricants: a global overview. **AOCS Inform**, v.20, n.4, p.256-9, 2009.

KANIA, D.; YUNUS, R.; OMAR, R.; ABDUL RASHID, S.; MOHAMAD JAN, B. A review of biolubricants in drilling fluids: Recent research, performance, and applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 135, p. 177–184, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2015.09.021>. Acesso em: 25 set. 2020.

KWON, S. J., SONG, K. M., HONG, W.H; RHEE, J. S. Removal of water produced from lipase-catalysed esterification in organic solvent by pervaporation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.46, p.393-395, 1995.

KHAN, N.R.; RATHOD, V.K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetics esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v.50, p.1793-1806, 2015.

KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v.47, p.555-569, 2012.

KIRAN, S.; ARSHADA, Z.; NOSHEENB, S.; KAMALA, S.; GUIZARA, T.; MAJEED, M. S.; JANNAT, M.; RAFIQUE, M. A. Microbial lipases: production and applications: A review. **Journal of Biochemistry, Biotechnology and Biomaterials**, v. 1, n. 2, p. 7–20, 2016.

KIRD, R.; AKACHA, N.B.; MESSAOUDI, Y.; GARGOURI, M. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using liquid-gas biphasic system by the transesterification reaction of isoamyl alcohol obtained from fusel oil. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.22, n.4, p.413-422, 2017.

KOLWZAN, B.; GRYGLEWICZ, S. Synthesis and biodegradability of some adipic and sebacic esters. **Journal of Synthetic Lubrication**, v.20, n.2, p.100-107, 2003.

KÜÇÜK, Z.; CEYLAN, K. Potential utilization of fusel oil: a kinetic approach for production of fusel oil esters through chemical reaction. **Turkish Journal of Chemistry**, v.22, p.289-300, 1998.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, n.1, p.81-87, 1987.

LAGE, F. A. P.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; TODERO, L.M.; LUIZ, J.H.H.; MENDES, A.A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.84, p.56-67, 2016.

LEUNG, K. K.; YAU, Y. H. The utilization of leftover as acid catalyst to catalyze the transesterification and esterification reactions. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 82, p. 12009, ago. 2017. Disponível em: <http://stacks.iop.org/1755-1315/82/i=1/a=012009?key=crossref.9c98123f3ac5b32d9f42a476dea76435>. Acesso em: 25 set. 2020.

LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. 3rd. ed. New York: Wiley, 2000.

LOURINHO, G.; BRITO, P. Advanced biodiesel production technologies: novel developments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 287–316, 2015.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.115-119, 1997.

MAROUNEK, M.; PAVLATA, L.; MISUROVA, L.; VOLEK, Z.; DVORAK, R. Changes in the composition of goat colostrum and milk fatty acids during the first month of lactation. **Czech Journal of Animal Science**, v. 57, n. 1, p. 28-33, 2012.

MCNUTT, J.; HE, Q. Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, p. 1–12, 2015.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotechnology Research**, v.8, p. 1944–328558, 2017.

MEUNIER, S. M.; KARIMINIA, H.-R.; LEGGE, R. L. Immobilized Enzyme Technology for Biodiesel Production. In: **Advances in Biofeedstocks and Biofuels**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 67–106.

MOBARAK, H. M. et al. The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 34–43, 2014.

MORRISON R. T., BOYD R. N., **Organic Chemistry**, 6^a edição, New York University, 1990.

MUKESH, D., JADHAV, S., BANERJI, A. A., THAKKAR, K., BEVINAKATTI, H. S. Lipase-catalysed esterification reactions-experimental and modeling studies. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.69, p.179-186, 1997.

NAKPONG, P.; WOOTHIKANOKKHAN, S. High free fatty acid coconut oil as a potential feedstock for biodiesel production in Thailand. **Renewable Energy**, v. 35, n. 8 p. 1682–1687, 2010.

NOVO NORDISK BIOINDUSTRIALS GROUP. A ação das enzimas, **Catálogo Informativo**, 1995, p.47.

PATIL, A.G.; KOOLWAL, S.W.; BUTALA, H.D. Fusel oil: composition, removal and potential utilization. *Inter. Sugar Journal*. v.104, n.51, 2002.

PÉREZ, E.R.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W. Análise dos álcoois, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel. **Química Nova**, v.24, n.1, p.10-12, 2001.

PORTAL LUBES. Disponível em: <http://portallubes.com.br/2019/06/mercado-de-lubrificantes-tem-alta-de-5-no-primeiro-quadrimestre/>. Ed.16/06/2019. Acesso em: 25 set.2020.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. (eds.) (2006). **Basic Biotechnology**, third ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

REEVES, C. J.; SIDDAIAH, A.; MENEZES, P. L. A review on the science and technology of natural and synthetic biolubricants. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 3, n. 1, p. 11, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40735-016-0069-5>. Acesso em: 25 set.2020.

RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, n.1-2, p.15-32, 2010.

RODRIGUES, R.C.; HERNANDEZ, K.; BARBOSA, O.; RUEDA, N.; GARCIA-GALAN, C.; DOS SANTOS, J.C.S.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of proteins in poly-styrene-divinylbenzene matrices: functional properties and applications, **Current Organic Chemistry**, v.19, p.1707-1718, 2015.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v.37, p.746-770, 2019.

RUDNICK, L.R; SHUBKIN, R.L. **Synthetic lubricants and high-performance functional fluids**. New York: Marcel Dekker; 1999. cap.1, p.3-5.

RUDNICK, L. R. **Synthetics, Mineral Oils, and Bio-Based Lubricants – Chemistry and Technology**, 2a.ed. CRC Press, 2006, cap.21, p. 22 -24.

SALIMON, J.; ABDULLAH, B.M.; YUSOP, R.M.; SALIH, N. Synthesis, reactivity and application studies for different biolubricants. **Chemistry Central Journal**, v.8, n.16, 2014.

SELMI, B., GONTIER, E., ERGAN, F., BARBOTIN, J. N., AND THOMAS, D. Lipase-catalyzed synthesis of tricaprylin in a medium solely composed of substrates; water production and elimination. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 20, p.322-325, 1997.

SILVA, J. A. C; FREIRE, D. M. G. Produção de biolubrificantes catalisada por lipases. *In*: Rodrigo Ribeiro Resende (Org.). **Biotecnologia Aplicada à Agro e Indústria**. 1ed. Blücher S/A, v.4, p.472-502, 2016.

SILVA, M. V. C., SOUZA, A. B. . DE CASTRO, H. F., AGUIAR, L.G, OLIVEIRA, P.C., FREITAS, L. Synthesis of 2-ethylhexyl oleate catalyzed by *Candida antarctica* lipase immobilized on a magnetic polymer support in continuous flow. **Bioprocess and Biosystems Engineering** v. 43, p. 615–623, 2020.

SIMÕES, A. S.; RAMOS, L.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. **Biofuel Research Journal**, v. 6, p. 242–247, 2015.

SINGH, Y., SHARMA, A.; SINGLA, A. Non-edible vegetable oil–based feedstocks capable of bio-lubricant production for automotive sector applications—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019, v. 26, p. 14867–14882. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-019-05000-9>. Acesso em: 25 set. 2020.

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A. M.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p.1846-1859, 2013.

UPPENBERG, J.; ANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p.293-308, 1994.

VILAS BÔAS, R. N. **Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas**. p.235. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; GIORDANI, D. S.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of isopentyl caprylate using fusel oil as feedstock. **Química Nova**, v. 40, n.5, p. 541-547, 2017.

VILAS BÔAS, R.N.; CERON, A.A.; BENTO, H.B.S.; CASTRO, H.F. Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil. **Biomass & Bioenergy**, v.119, p.61-68, 2018.

VILLA LOBOS, Maribel C. **Síntese enzimática de ésteres de α -D-glucose utilizando sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia contaminans* LTEB11**. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, A.; GRAILLE, J.; HASS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.

WATANABE, Y., NAGAO, T., NISHIDA Y, TAKAGI Y, SHIMADA Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1015-1021, 2007 a.

WATANABE Y, PINSIRODOM P, NAGAO T, YAMAUCHI A, KOBAYASHI T, NISHIDA Y, TAKAGI Y, SHIMADA Y. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 99–105, 2007 b.

WELSH, F.H.; MURRAY, W.D.; WILLIAMS, R.E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. **Journal of Food Science**, v.54, n.6, p.1565-1568, 1989.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzes reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p.438-450, 1998.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.17, p.8017-8021, 1988.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Enzimas imobilizadas. *In*: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. cap. 4. p. 35-85.

APÊNDICES**APÊNDICE A****Análise do óleo fúsel****LABORATÓRIO DE ANÁLISES****Solicitante:** SÃO MARTINHO S/A - UNIDADE IRACEMA**Endereço:** USINA IRACEMA - ZONA RURAL - CAIXA POSTAL 31 - Iracemápolis - SP.**Data de Recebimento:** 24/10/2014**Data de Emissão:** 27/10/2014**Safra:** 14/15**CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 4813/2014.0****MATERIAL:** Óleo fúsel**IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:** ÓLEO FÚSEL**DATA DA COLETA:** 21/10/2014

Característica	Unidade	Valor
Água	% m.m ⁻¹	14,76
Álcool butílico + amílico	% m.m ⁻¹	73,22
Álcool isoamílico	% m.m ⁻¹	64,98
Álcool isobutílico	% m.m ⁻¹	7,86
Álcool n-butílico	% m.m ⁻¹	0,38
Álcool n-Propílico	% m.m ⁻¹	1,27
Etanol	% m.m ⁻¹	9,22

Observações Complementares

Período de Execução das Análises: 27/10/2014 à 27/10/2014

OBS.: Resultado (s) representativo (s) da (s) amostra (s) recebida (s). Este Certificado não poderá ser reproduzido exceto na sua totalidade.

O valor indicado com o sinal “menor que” (<) significa abaixo do limite de detecção do respectivo método.

Certificado eletrônico com garantia de autenticidade.

Fazenda Santo Antônio, s/n. Bairro Santo Antônio -Piracicaba, SP. CEP: 13400-970 - CP. 162.
Fone: 19 3429-8199 | Fax: 19 3429-8106 | www.ctc.com.br

APÊNDICE B

Seleção da fonte de lipase imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do estearato de isoamila

Lipase *Candida rugosa*

Condições reacionais (Razão molar 1:1 Álcool Isoamílico /Ácido Esteárico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;

Enzima no meio reacional =1,50 g;

Atividade hidrolítica da enzima = 4.127,6 U.g⁻¹; Umidade da enzima imobilizada = 7,5%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 250 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,2503%

Tempo (h)	Concentração						Estearato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	413,4	1,45	-	126,1	1,43	-	2,8	0,01	0	0
2	344,3	1,21	0,29	104,8	1,19	0,24	102,0	0,29	20,00	16,78
5	192,8	0,68	0,77	45,5	0,52	0,91	205,3	0,58	53,10	63,64
24	53,3	0,19	1,26	13,0	0,15	1,28	221,8	0,95	86,90	88,81
48	10,4	0,04	1,41	2,3	0,03	1,40	368,5	1,04	97,24	97,90

Tempo (h)	Concentração						Estearato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	417,2	1,42	-	126,1	1,43	-	2,8	0,01	0	0
2	301,6	1,05	0,37	103,6	1,18	0,25	106,9	0,30	26,06	17,48
5	169,4	0,60	0,82	73,3	0,83	0,60	197,3	0,56	57,75	41,96
24	40,5	0,14	1,28	23,4	0,27	1,16	393,1	1,10	90,14	81,12
48	19,9	0,07	1,35	7,8	0,09	1,34	382,2	1,11	95,07	93,71

Conversão molar do ácido esteárico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
2	20,0	26,06	16,78	17,48	18,39	2,27	21,77	6,07
5	53,1	57,75	63,64	41,96	58,37	7,45	49,86	11,16
24	86,9	90,14	88,81	81,12	87,86	1,35	85,63	6,34
48	97,24	95,07	97,9	93,71	97,57	0,47	94,39	0,96

Formação do estearato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	0,29	0,30	0,29	0,007
5	0,58	0,56	0,57	0,014
24	0,95	1,1	1,02	0,106
48	1,04	1,11	1,08	0,049

Fonte: Próprio autor.

Lipase CALB L (*Candida antarctica*)

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Esteárico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;Enzima no meio reacional =2,00 g; Atividade sintética = 239,31 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 6,8%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,3890%

Tempo (h)	Concentração						Esterato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	370,1	1,30	0	117,4	1,33	0	49,0	0	0	0
2	101,1	0,36	0,94	36,7	0,42	0,91	177,0	0,50	72,31	68,42
5	38,5	0,14	1,16	19,2	0,22	1,11	244,3	0,69	89,23	83,46
24	20,3	0,07	1,23	13,9	0,08	1,17	394,4	0,86	94,62	87,97
48	9,9	0,05	1,25	8,6	0,06	1,24	378,2	1,07	96,15	93,23

Tempo (h)	Concentração						Esterato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	371,1	1,30	-	117,4	1,33	-	49,0	0	0	0
2	101,6	0,38	0,94	34,6	0,39	0,94	183,2	0,94	72,31	70,68
5	38,7	0,15	1,16	38,7	0,26	1,07	258,7	1,12	89,23	80,45
24	28,5	0,10	1,20	28,5	0,23	1,10	299,6	1,15	92,31	82,71
48	13,4	0,05	1,25	13,4	0,14	1,19	323,4	1,22	96,15	89,47

Conversão molar do ácido esteárico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
2	72,31	68,42	72,31	70,68	72,31	0	69,55	1,59
5	89,23	83,46	89,23	80,45	89,23	0	81,96	2,12
24	94,62	87,97	92,31	82,71	93,46	1,63	85,34	3,71
48	96,15	93,23	96,15	89,47	96,15	0	91,35	2,65

Formação do estearato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	0,5	0,94	0,72	0,31
5	0,69	1,12	0,91	0,30
24	0,86	1,15	1,00	0,21
48	1,07	1,22	1,15	0,11

Fonte: Próprio autor.

Lipase *Rhizopus oryzae*

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Esteárico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;Enzima no meio reacional =2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 4.413,1 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 6,6%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,2355%

Tempo (h)	Concentração						Esterato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	383,8	1,35	-	120,6	1,37	-	89,8	0	0	0
2	217,1	0,76	0,59	65,3	0,74	0,63	128,7	0,36	43,70	45,99
5	52,80	0,19	1,16	67,1	0,16	1,21	166,3	0,47	85,93	88,32
24	13,0	0,05	1,30	21,1	0,04	1,33	393,1	1,11	96,30	97,08

Tempo (h)	Concentração						Esterato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	408,9	1,46	-	128,6	1,46	-	77,8	0	0	0
2	102,0	0,45	1,01	54,8	0,62	0,84	277,9	0,38	69,18	57,53
5	51,7	0,18	1,26	39,6	0,15	1,01	279,8	0,79	86,30	69,18
24	19,5	0,07	1,37	11,7	0,03	1,33	360,4	1,05	93,84	91,10

Conversão molar do ácido esteárico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
2	43,7	45,99	69,18	57,53	56,44	18,017	51,76	8,16
5	85,93	88,32	86,3	69,18	86,115	0,26	78,75	13,53
24	96,3	97,08	93,84	91,1	95,07	1,74	94,09	4,23

Formação do estearato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	0,36	0,38	0,37	0,014
5	0,47	0,79	0,63	0,22
24	1,11	1,05	1,08	0,042

Fonte: Próprio autor.

Lipase G (*Penicillium camemberti*)

Condições reacionais (Razão molar 1:1, Álcool Isoamílico /Ácido Esteárico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;Enzima no meio reacional =2,00 g; Atividade sintética = 221,98 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 6,0%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,2353%

Tempo (h)	Concentração						Esterato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	377,7	1,33	-	117,1	1,33	-	0,18	0,01	0	0
2	325,5	1,14	0,19	85,8	0,97	0,36	154,4	0,28	14,29	27,08
5	184,3	0,65	0,68	55,4	0,63	0,70	198,1	0,69	51,13	52,63
24	52,8	0,19	1,14	21,1	0,24	1,09	229,7	1,12	85,71	81,95

Tempo (h)	Concentração						Esterato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	377,7	1,35	-	117,1	1,36	-	0,18	0,02	0	0
2	325,5	1,20	0,15	85,8	1,01	0,35	154,4	0,25	11,11	25,74
5	184,3	0,74	0,61	55,4	0,68	0,68	198,1	0,65	45,19	50,00
24	52,8	0,15	1,20	21,1	0,21	1,15	229,7	1,18	88,89	84,56

Conversão molar do ácido esteárico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
2	14,29	27,08	11,11	25,74	12,70	2,25	26,41	0,94
5	51,13	52,63	45,19	50,00	48,16	4,20	51,31	1,86
24	85,71	81,95	88,89	84,56	87,30	2,25	83,25	1,85

Formação do estearato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	0,28	0,25	0,26	0,02
5	0,69	0,65	0,67	0,03
24	1,12	1,18	1,15	0,04

Fonte: Próprio autor.

Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*)

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Esteárico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;Enzima no meio reacional =2,00 g; Atividade hidrolítica da enzima = 2.033 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 5,3%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,3714%

Tempo (h)	Concentração						Estearato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	422,8	1,49	-	126,1	1,43	-	0,18	0,01	0	0
2	399,9	1,39	0,10	110,4	1,29	0,14	37,9	0,11	6,71	9,79
5	394,6	1,38	0,11	113,8	1,25	0,18	37,9	0,11	7,38	12,59
24	231,2	0,81	0,68	102,2	1,16	0,27	18,7	0,25	45,64	18,88

Tempo (h)	Concentração						Estearato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	422,8	1,48	-	126,1	1,44	-	0,18	0,01	0	0
2	399,9	1,37	0,11	110,4	1,27	0,17	37,9	0,14	7,43	11,81
5	394,6	1,35	0,13	113,8	1,21	0,23	37,9	0,18	8,78	15,97
24	231,2	0,78	0,70	102,2	1,08	0,36	18,7	0,33	47,30	25,00

Conversão molar do ácido esteárico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
2	6,71	9,79	7,43	11,81	7,07	0,51	10,80	1,43
5	7,38	12,59	8,78	15,97	8,08	0,99	14,28	2,39
24	45,64	18,88	47,30	25,00	46,47	1,17	21,94	4,32

Formação do estearato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	0,11	0,14	0,125	0,021
5	0,11	0,18	0,145	0,050
24	0,25	0,33	0,29	0,057

Fonte: Próprio autor.

Lipase *Thermomyces lanuginosus*

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Esteárico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;Enzima no meio reacional =1,50 g; Atividade hidrolítica da enzima = 1.995 U.g⁻¹

Umidade da enzima imobilizada = 4,3%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,2949%

Tempo (h)	Concentração						Estearato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	424,3	1,49	-	131,2	1,49	-	0,36	0,01	0	0
72	188,4	0,66	0,83	73,3	0,83	0,66	151,1	0,75	55,70	44,30
96	35,6	0,14	1,35	18,0	0,20	1,29	320,5	1,32	90,60	86,58

Tempo (h)	Concentração						Estearato de Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	424,3	1,49	-	131,2	1,49	-	0,36	0,01	0	0
72	190,4	0,67	0,82	73,3	0,83	0,66	151,1	0,74	55,03	44,30
96	35,5	0,12	1,37	25,0	0,28	1,21	320,5	1,29	91,95	86,58

Conversão molar do ácido esteárico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
72	55,70	44,30	55,03	44,30	55,37	0,47	44,30	0
96	90,60	86,58	91,95	86,58	91,28	0,95	86,58	0

Formação do estearato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
72	0,75	0,74	0,745	0,007
96	1,32	1,29	1,305	0,021

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE C

Seleção da fonte de lipase imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese de oleato de isoamila

Lipase *Candida rugosa*

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Oleico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;

Enzima no meio reacional =2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 4.127 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 7,5%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,0522%

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	407,9	1,44	-	127,2	1,44	-	2,7	0,01	0	0
2	242,6	0,86	0,58	79,20	0,90	0,54	204,6	0,58	40,28	37,50
5	71,7	0,25	1,19	14,4	0,18	1,26	437,8	1,20	82,64	87,50
10	38,2	0,14	1,30	15,8	0,15	1,29	423,4	1,25	90,28	89,58
24	23,7	0,07	1,37	2,9	0,03	1,41	496,8	1,40	95,14	97,92

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	407,9	1,44	-	127,2	1,44	-	2,7	0,01	0	0
2	231,0	0,82	0,62	89,7	1,02	0,42	244,1	0,69	43,06	29,17
5	71,7	0,26	1,18	25,9	0,29	1,15	283,7	0,98	81,94	79,86
10	38,2	0,15	1,29	15,8	0,17	1,27	423,4	1,20	89,58	88,19
24	23,4	0,06	1,38	2,9	0,03	1,41	505,4	1,43	95,83	97,92

Conversão molar do ácido oleico e álcool isoamílico (%)

Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
				Média	Desvio	Média	Desvio
40,28	37,50	43,06	29,17	41,67	1,96	33,34	5,89
82,64	87,50	81,94	79,86	82,29	0,49	83,68	5,40
90,28	89,58	89,58	88,19	89,93	0,49	88,89	0,98
95,14	97,92	95,83	97,92	95,48	0,48	97,92	0

Formação do oleato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	0,58	0,69	0,63	0,078
5	1,20	0,98	1,1	0,15
10	1,25	1,20	1,25	0,035
24	1,40	1,43	1,42	0,021

Fonte: Próprio autor.

Lipase *Thermomyces lanuginosus*

Condições reacionais

Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Oleico

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;

Enzima no meio reacional =2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 1.629,0 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 4,3%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional= 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,0522%

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	419,1	1,49	-	127,3	1,47	-	0,3	0,01	0	0
48	376,0	1,33	0,16	120,0	1,36	0,11	2,4	0,01	10,74	7,48
72	284,8	1,00	0,49	83,2	0,94	0,53	192,7	0,54	34,03	36,05
96	188,9	0,67	0,82	54,9	0,62	0,85	371,7	1,10	56,94	57,82

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	419,5	1,49	-	135,6	1,50	-	0,36	0,01	0	0
48	378,0	1,34	0,15	123,0	1,40	0,10	2,10	0,01	10,07	6,67
72	283,9	1,00	0,49	80,5	0,91	0,59	184,1	0,52	32,89	39,33
96	175,8	0,62	0,87	47,7	0,54	0,96	433,8	1,20	58,39	64,00
120	29,2	0,10	1,39	7,2	0,08	1,42	508,3	1,44	93,29	94,67

Conversão molar do ácido oleico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
48	10,74	7,48	10,07	6,67	10,41	0,47	7,07	0,57
72	34,03	36,05	32,89	39,33	33,46	0,80	37,69	2,32
96	56,94	57,82	58,39	64,00	57,665	1,02	60,91	4,37
120	96,53	95,24	93,29	94,67	94,91	2,29	94,96	0,40

Formação do oleato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
72	0,54	0,52	0,53	0,014
96	1,10	1,20	1,15	0,07
120	1,43	1,44	1,435	0,007

Fonte: Próprio autor.

Lipase *Rhizopus oryzae*

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Oleico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹Enzima no meio reacional =2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 4.413 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 6,6%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional = 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,0522%

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	405,4	1,44	-	127,2	1,44	-	2,7	0,01	0	0
2	88,9	0,31	1,13	25,9	0,29	1,15	446,4	1,26	78,47	79,86
5	27,4	0,10	1,34	20,5	0,13	1,31	472,0	1,33	93,06	92,36
24	11,4	0,04	1,40	6,5	0,07	1,37	518,4	1,43	97,22	99,31

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	404,7	1,43	-	127,2	1,44	-	2,7	0,01	0	0
2	89,9	0,31	1,12	26,0	0,29	1,15	492,5	1,22	78,32	79,86
5	65,8	0,13	1,30	23,8	0,17	1,27	427,7	1,31	90,91	88,19
24	20,2	0,07	1,36	5,4	0,06	1,38	513,0	1,41	95,10	95,83

Conversão molar do ácido oleico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
2	78,47	79,86	78,32	79,86	78,39	0,11	79,86	0
5	93,06	92,36	90,91	88,19	91,98	1,52	90,28	2,95
24	78,47	79,86	78,32	79,86	78,39	0,11	79,86	0

Formação do oleato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	1,26	1,22	1,24	0,03
5	1,33	1,31	1,32	0,01
24	1,43	1,41	1,42	0,01

Fonte: Próprio autor.

Lipase CALB L (*Candida antarctica*)

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Oleico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;

Enzima no meio reacional =2,0 g; Umidade da enzima imobilizada = 6,8%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional = 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,0522%

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	421,7	1,49	-	133,0	1,50	-	1,20	0,01	0	0
2	224,7	0,79	0,70	67,9	0,77	0,73	290,9	0,82	46,98	48,67
5	83,0	0,29	1,20	23,0	0,26	1,24	489,6	1,38	80,54	82,67
24	10,1	0,03	1,46	3,6	0,04	1,46	526,3	1,48	97,99	97,33

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	407,7	1,44	-	133,2	1,51	-	1,20	0,01	0	0
2	230,6	0,78	0,66	70,2	0,80	0,71	300,3	0,85	45,83	47,02
5	67,1	0,24	1,20	17,3	0,20	1,31	479,5	1,35	83,33	86,75
24	9,41	0,03	1,41	2,9	0,03	1,48	525,6	1,44	97,92	98,01

Conversão molar do ácido oleico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
2	78,47	79,86	78,32	79,86	78,39	0,11	79,86	0
5	93,06	92,36	90,91	88,19	91,98	1,52	90,28	2,95
24	78,47	79,86	78,32	79,86	78,39	0,11	79,86	0

Formação do oleato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	1,26	1,22	1,24	0,03
5	1,33	1,31	1,32	0,01
24	1,43	1,41	1,42	0,01

Fonte: Próprio autor.

Lipase G (*Penicillium camemberti*)

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Oleico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;

Enzima no meio reacional =2,0 g; Umidade da enzima imobilizada = 6,0%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional = 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,0522%

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	412,7	1,46	-	129,3	1,47	-	0,3	0,01	0	0
2	410,0	1,45	-	126,6	1,44	0,03	30,6	0,09	0	0
5	284,9	1,01	0,45	82,5	0,99	0,48	225,7	0,64	30,82	32,65
24	9,3	0,03	1,43	5,0	0,06	1,41	505,0	1,43	97,95	95,92

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**				
0	412,7	1,45	-	129,3	1,46	-	0,3	0,01	0	0
2	410,0	1,43	-	126,6	1,42	0,04	30,6	0,08	0	0
5	284,9	1,05	0,40	82,5	0,97	0,49	225,7	0,66	27,59	33,56
24	9,3	0,02	1,43	5,0	0,05	1,41	505,0	1,44	98,62	96,58

Conversão molar do ácido oleico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
5	30,82	32,65	27,59	33,56	29,205	2,28	33,11	0,64
24	97,95	95,92	98,62	96,58	98,285	0,47	96,25	0,47

Formação do oleato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
2	0,09	0,08	0,85	0,007
5	0,64	0,66	0,65	0,014
24	1,43	1,44	1,44	0,007

Fonte: Próprio autor.

Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*)

Condições reacionais (Razão molar 1:1 de Álcool Isoamílico /Ácido Oleico);

Concentração 1,5 mol.L⁻¹;Enzima no meio reacional =2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 2.033 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 5,3%;

Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, T 45 °C; Volume do meio reacional = 20 mL;

Teor de água no meio reacional = 0,0522%

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	405,7	1,44	-	127,2	1,44	-	2,7	0,01	0	0
2	403,7	1,43	-	123,9	1,41	-	1,5	0,01	0	0
5	414,2	1,45	-	126,0	1,43	-	2,4	0,01	0	0
24	372,8	1,32	0,12	108,0	1,28	0,16	88,2	0,25	8,33	11,11
48	186,6	0,66	0,78	58,3	0,68	0,76	380,9	0,66	54,17	52,78

Tempo (h)	Concentração						Oleato Isoamila		Conversão Molar (%)	
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico						
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	Ácido	Álcool
0	405,7	1,44	-	127,2	1,45	-	2,7	0,01	0	0
2	403,7	1,43	-	123,9	1,43	-	1,5	0,02	0	0
5	414,2	1,41	-	126,0	1,42	-	2,4	0,02	0	0
24	372,8	1,30	0,14	108,0	1,30	0,15	88,2	0,27	9,72	10,34
48	186,6	0,68	0,76	58,3	0,70	0,75	380,9	0,69	52,78	51,72

Conversão molar do ácido oleico e álcool isoamílico (%)

Tempo h	Ácido %	Álcool %	Ácido %	Álcool %	Ácido %		Álcool %	
					Média	Desvio	Média	Desvio
24	8,33	11,11	9,72	10,34	9,03	0,98	10,72	0,54
48	54,17	52,78	52,78	51,72	53,47	0,98	52,25	0,75
72	95,83	96,53	96,53	97,24	96,18	0,49	96,89	0,50

Formação do oleato de isoamila (mol.L⁻¹)

Tempo h	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	Éster mol.L ⁻¹	
			Média	Desvio
5	0,01	0,02	0,15	0,007
24	0,25	0,27	0,26	0,014
48	0,66	0,69	0,67	0,021

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE D

Planejamento experimental: Esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* (ROL), imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do estearato de isoamila

Enzima no meio reacional = 2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 3.390,7 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 8,14%;

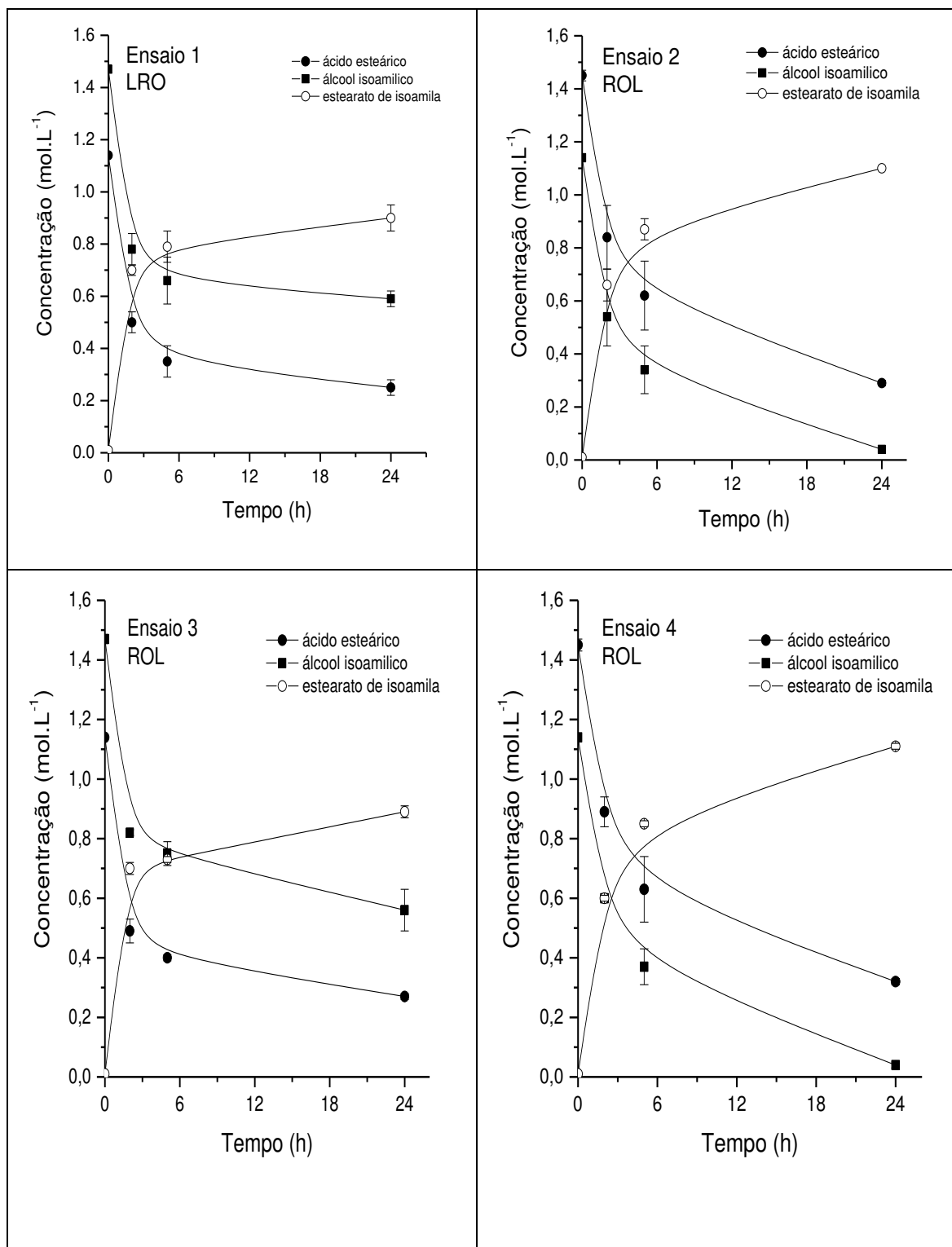
Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, Volume do meio reacional = 20 mL

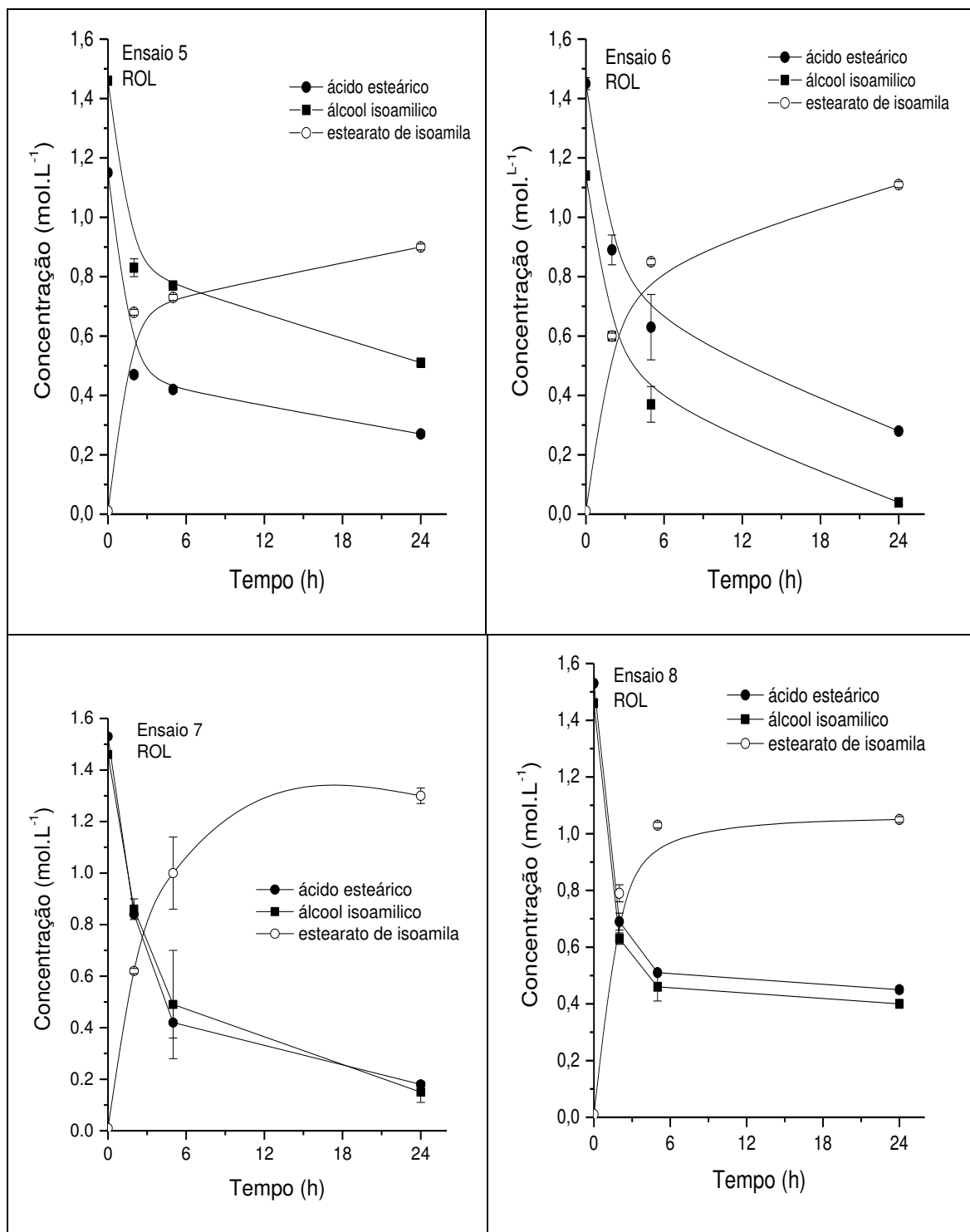
Razão molar Ácido : álcool	Concentração ácido esteárico (mol.L ⁻¹)	Concentração álcool isoamílico (mol.L ⁻¹)	Teor de água (%)
0,75:1	1,15	1,46	0,304
1:1	1,53	1,45	0,070
1,25:1	1,45	1,14	0,352

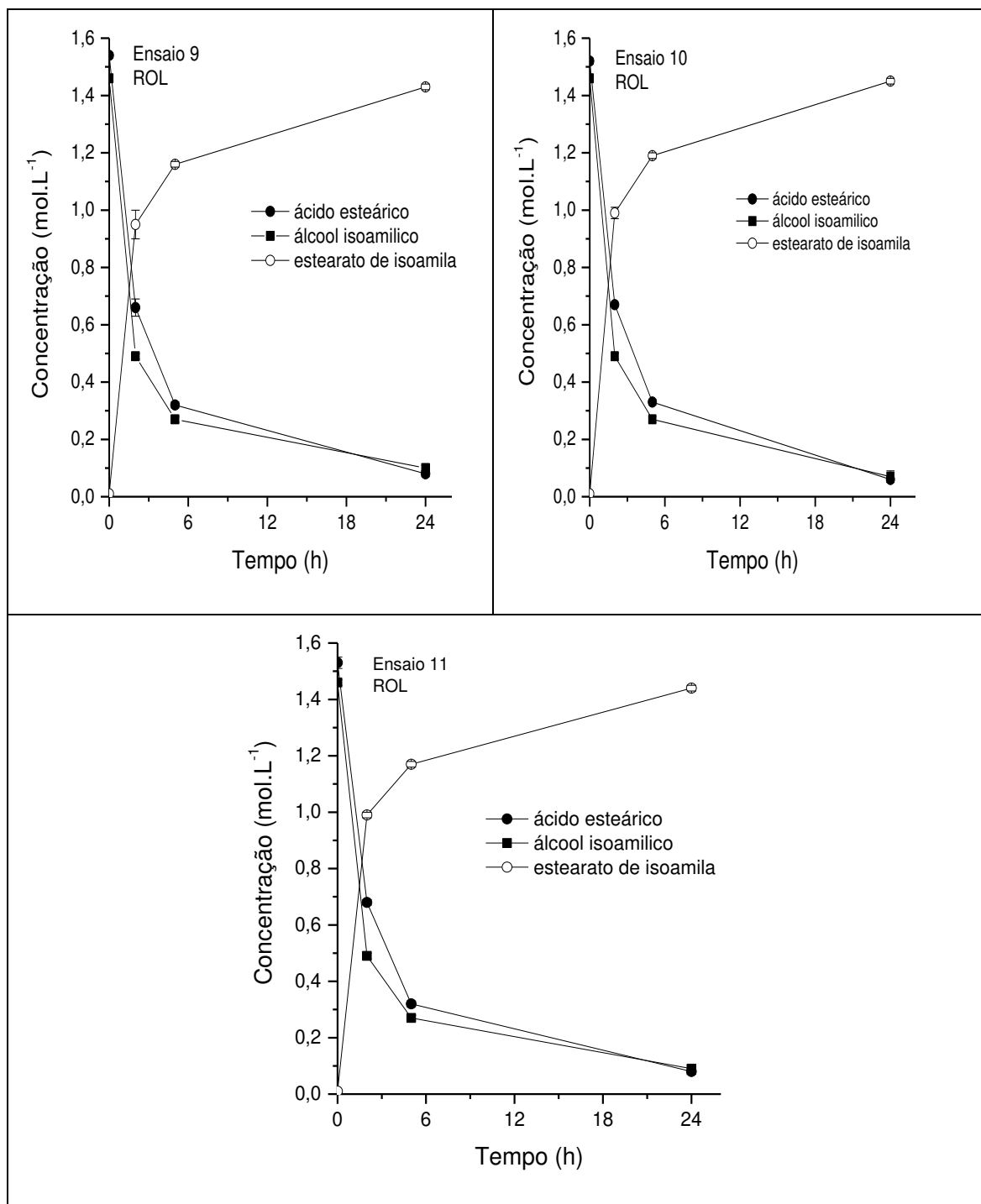
Matriz experimental e resultados obtidos (24h) no planejamento fatorial 2² com face centrada na síntese do estearato de isoamila catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* (ROL)

Ensaio	Variável Independente		Variável Resposta		
	Razão Molar Ácido: Álcool	Temperatura (°C)	Conversão molar (%)		Estearato de isoamila (mol.L ⁻¹)
			Ácido esteárico	Álcool Isoamílico	
1	0,75:1 (-1)	40 (-1)	78,1 ± 2,47	59,9 ± 1,91	0,90 ± 0,05
2	1,25: 1 (1)	40 (-1)	80,3 ± 0,21	96,5 ± 1,27	1,10 ± 0,00
3	0,75: 1 (-1)	50 (1)	76,8 ± 0,64	61,9 ± 4,81	0,88 ± 0,02
4	1,25: 1 (1)	50 (1)	78,2 ± 0,85	96,5 ± 1,27	1,11 ± 0,01
5	0,75: 1 (-1)	45 (0)	76,5 ± 1,06	65,2 ± 0,14	0,90 ± 0,01
6	1,25: 1 (1)	45 (0)	81,0 ± 0,78	96,5 ± 1,27	1,11 ± 0,01
7	1:1 (0)	40 (-1)	88,2 ± 0,99	89,8 ± 2,76	1,30 ± 0,03
8	1:1 (0)	50 (1)	70,9 ± 0,42	72,6 ± 0,71	1,05 ± 0,01
9	1:1 (0)	45(0)	95,1 ± 0,42	93,5 ± 0,42	1,43 ± 0,01
10	1:1(0)	45(0)	96,1 ± 0,92	95,6 ± 1,48	1,45 ± 0,01
11	1:1(0)	45(0)	95,1 ± 0,42	94,2 ± 0,49	1,44 ± 0,01

Fonte: Próprio autor.







Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE E

Planejamento experimental: Esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico catalisada pela lipase *Candida antarctica* (CALB L), imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do estearato de isoamila

Enzima no meio reacional = 2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 266,2 U.g⁻¹;

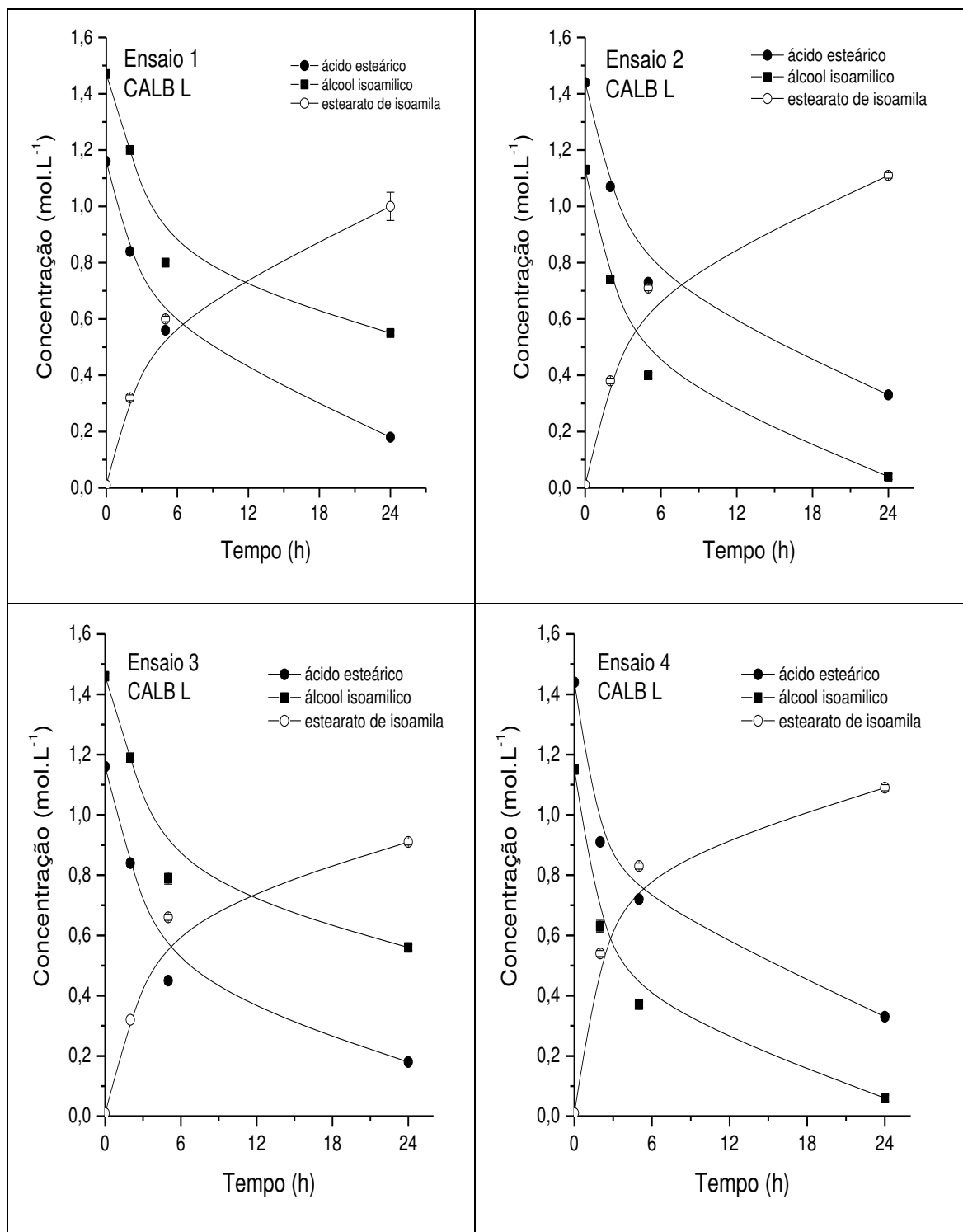
Umidade da enzima imobilizada = 9,50%;

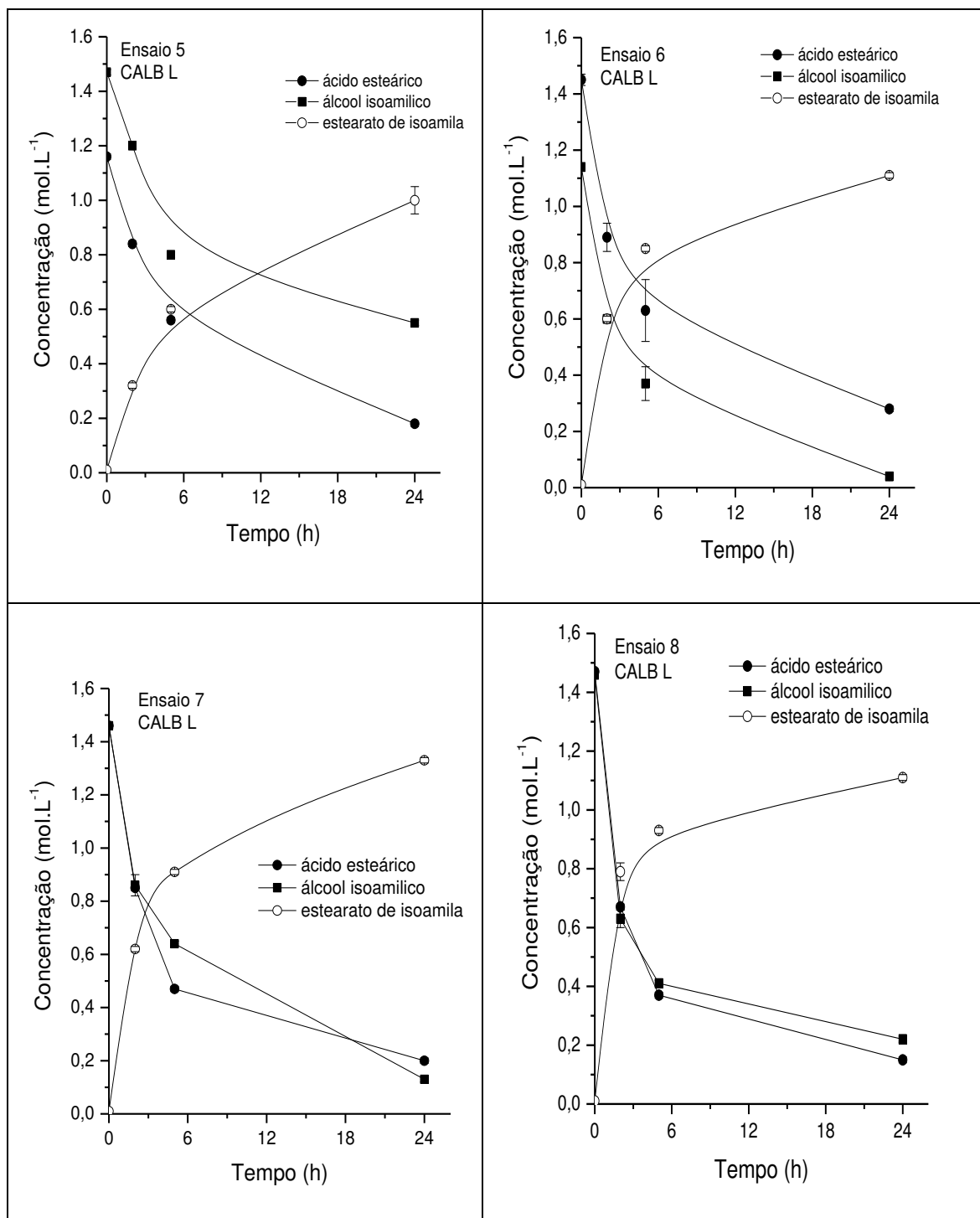
Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, Volume do meio reacional = 20 mL

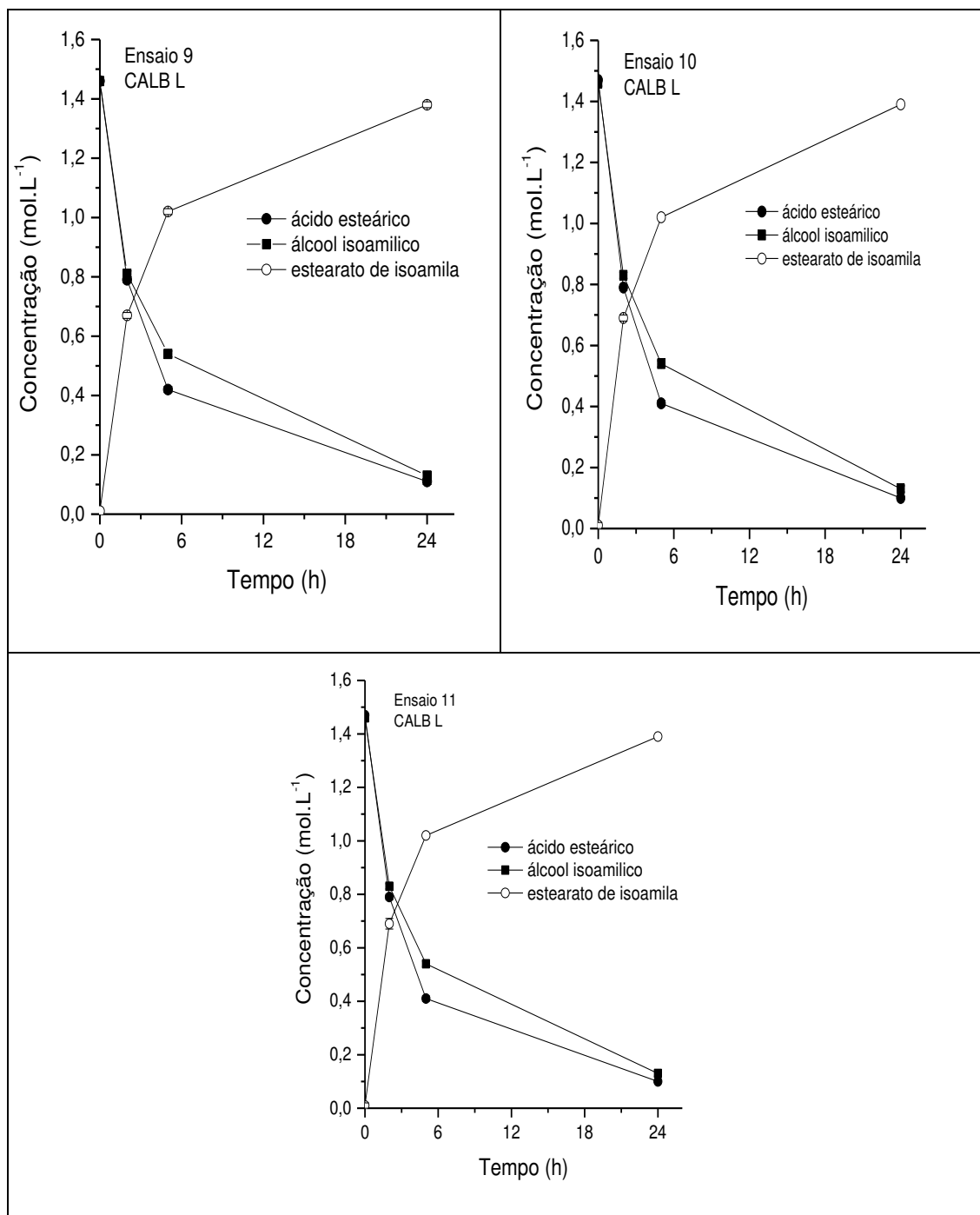
Razão molar Ácido: álcool	Concentração ácido esteárico (mol.L ⁻¹)	Concentração álcool isoamílico (mol.L ⁻¹)	Teor de água (%)
0,75:1	1,15	1,45	0,083
1:1	1,47	1,46	0,066
1,25:1	1,44	1,15	0,066

Matriz experimental e resultados obtidos (24h) no planejamento fatorial 2² com face centrada na síntese do estearato de isoamila catalisada pela lipase *Candida antarctica* (CALB L)

Ensaio	Variável Independente		Variável Resposta		
	Razão Molar Ácido: Álcool	Temperatura (°C)	Conversão molar (%)		Estearato de isoamila (mol.L ⁻¹)
			Ácido Esteárico	Álcool Isoamílico	
1	0,75:1 (-1)	40 (-1)	84,8 ± 0,71	62,5 ± 1,20	0,96 ± 0,05
2	1,25: 1 (1)	40 (-1)	77,0 ± 0,85	96,9 ± 0,71	1,11 ± 0,01
3	0,75: 1 (-1)	50 (1)	84,8 ± 0,71	61,9 ± 0,64	0,91 ± 0,01
4	1,25: 1 (1)	50 (1)	77,0 ± 0,85	94,8 ± 1,20	1,09 ± 0,01
5	0,75: 1 (-1)	45 (0)	92,6 ± 0,57	70,0 ± 1,13	1,07 ± 0,02
6	1,25: 1 (1)	45 (0)	79,5 ± 0,35	90,4 ± 1,13	1,01 ± 0,00
7	1:1 (0)	40 (-1)	87,4 ± 1,34	91,1 ± 0,85	1,33 ± 0,01
8	1:1 (0)	50 (1)	89,8 ± 1,06	84,9 ± 1,13	1,11 ± 0,01
9	1:1 (0)	45(0)	92,8 ± 0,57	91,8 ± 0,07	1,38 ± 0,01
10	1:1(0)	45(0)	93,2 ± 0,00	91,1 ± 1,06	1,39 ± 0,00
11	1:1(0)	45(0)	93,4 ± 0,00	91,2 ± 1,10	1,44 ± 0,01







Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE F

Planejamento experimental: Esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* (ROL), imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do oleato de isoamila

Enzima no meio reacional = 2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 2.998,0 U.g⁻¹;

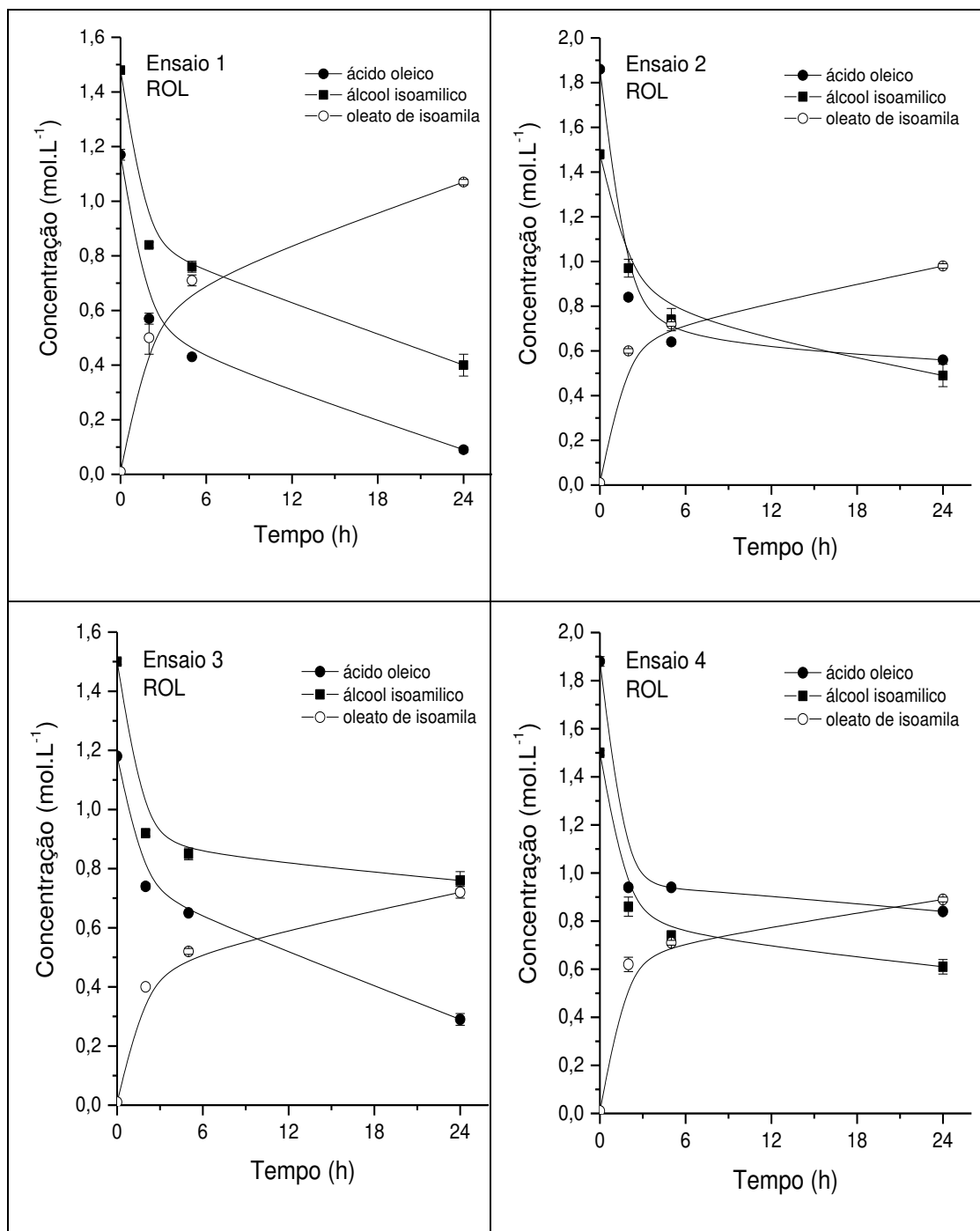
Umidade da enzima imobilizada = 5,50%;

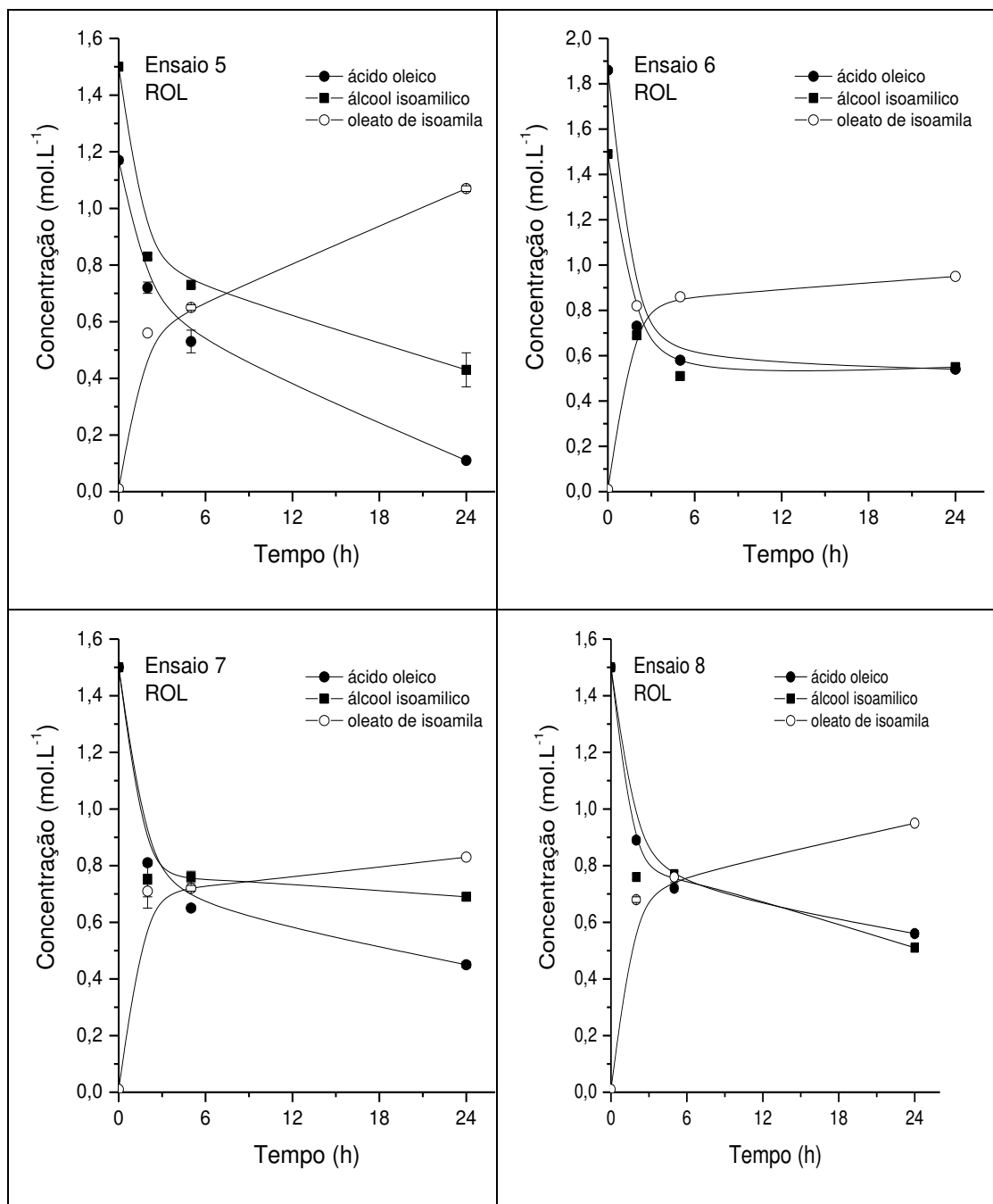
Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, Volume do meio reacional = 20 mL

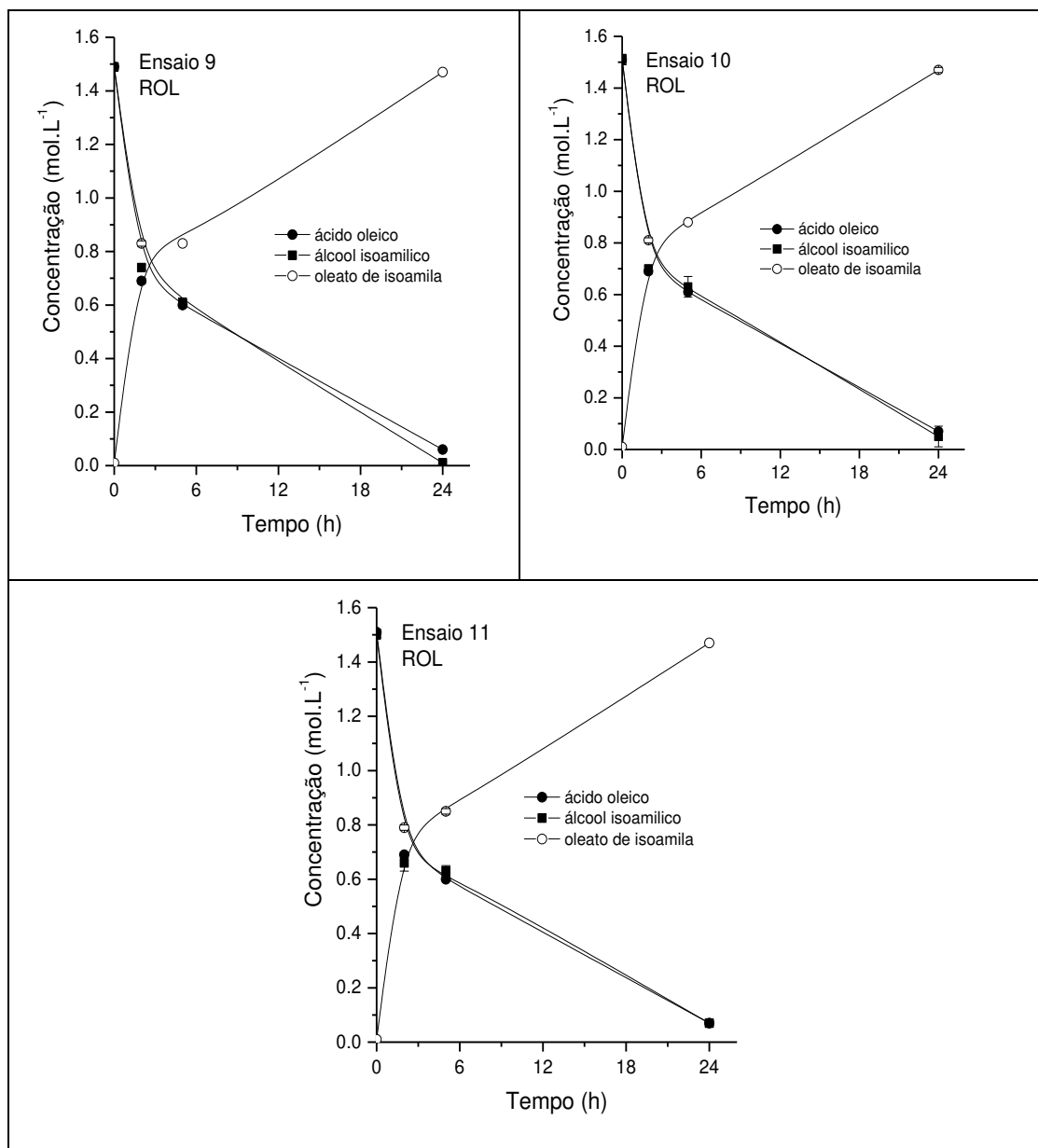
Razão molar Ácido: álcool	Concentração ácido oleico (mol.L ⁻¹)	Concentração álcool isoamílico (mol.L ⁻¹)	Teor de água (%)
0,75:1	1,17	1,50	0,081
1:1	1,50	1,49	0,070
1,25:1	1,86	1,49	0,066

Matriz experimental e resultados obtidos (24h) no planejamento fatorial 2² com face centrada na síntese do oleato de isoamila catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* (ROL)

Ensaio	Variável Independente		Variável resposta		
	Razão Molar Ácido: Álcool	Temperatura (°C)	Conversão molar (%)		Oleato de isoamila (mol.L ⁻¹)
			Ácido Oleico	Álcool Isoamílico	
1	0,75:1 (-1)	40 (-1)	92,7 ± 0,71	73,0 ± 2,83	1,07 ± 0,01
2	1,25: 1 (1)	40 (-1)	69,9 ± 0,99	67,3 ± 3,32	0,98 ± 0,01
3	0,75: 1 (-1)	50 (1)	75,9 ± 1,77	49,2 ± 2,12	0,72 ± 0,02
4	1,25: 1 (1)	50 (1)	55,5 ± 0,92	59,2 ± 2,12	0,89 ± 0,01
5	0,75: 1 (-1)	45 (0)	90,6 ± 0,14	71,4 ± 3,75	1,07 ± 0,01
6	1,25: 1 (1)	45 (0)	70,9 ± 0,14	63,3 ± 0,71	0,95 ± 0,00
7	1:1 (0)	40 (-1)	70,7 ± 0,00	54,2 ± 0,28	0,83 ± 0,00
8	1:1 (0)	50 (1)	62,6 ± 0,21	85,9 ± 1,13	0,95 ± 0,00
9	1:1 (0)	45(0)	96,0 ± 0,00	99,3 ± 0,00	1,47 ± 0,00
10	1:1(0)	45(0)	95,4 ± 0,07	98,4 ± 0,49	1,47 ± 0,01
11	1:1(0)	45(0)	95,4 ± 0,07	95,7 ± 0,49	1,47 ± 0,00







Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE G

Planejamento experimental: Esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase *Candida antarctica* (CALB L), imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do oleato de isoamila

Enzima no meio reacional = 2,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 266,2 U.g⁻¹;

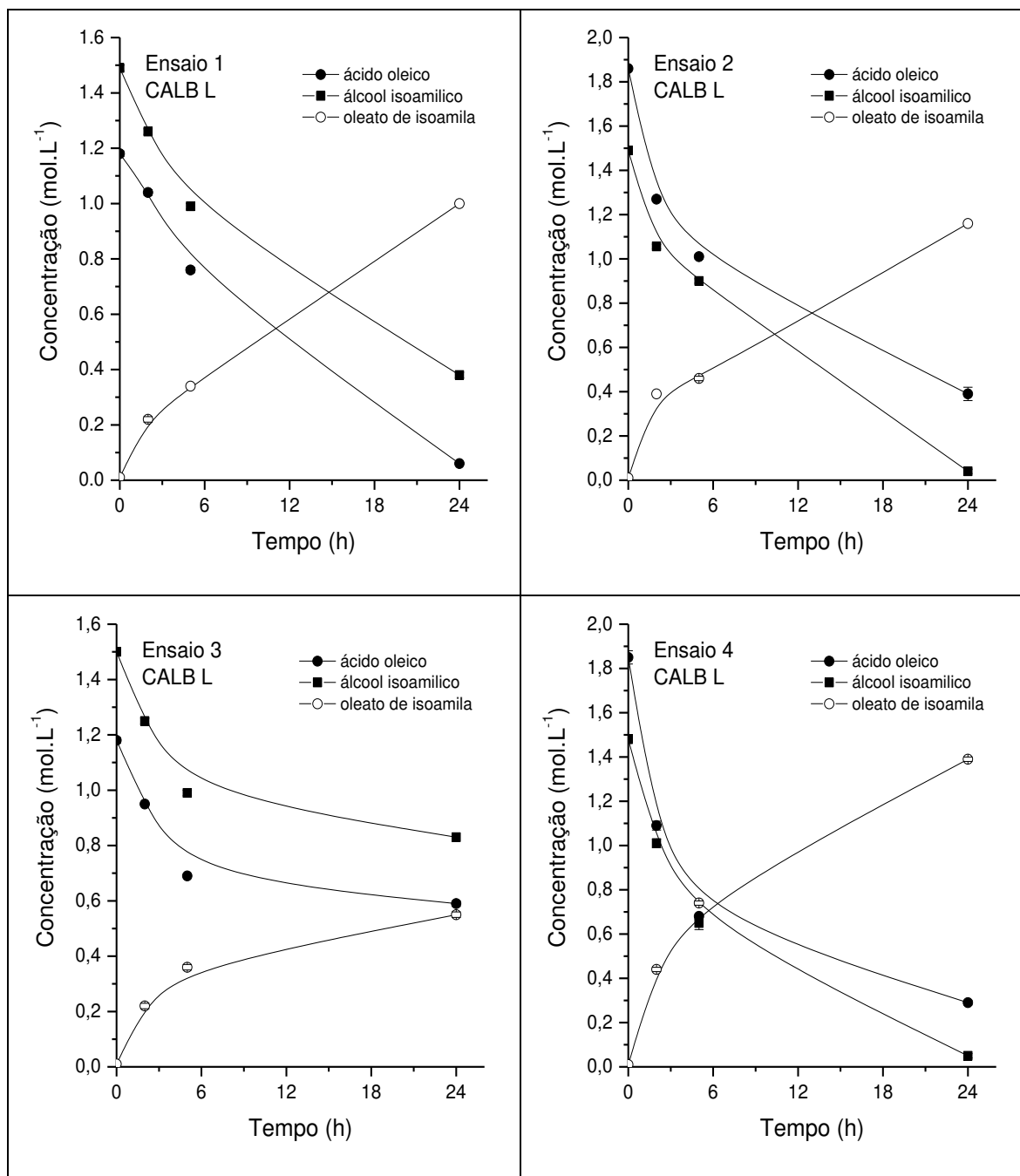
Umidade da enzima imobilizada = 9,50%;

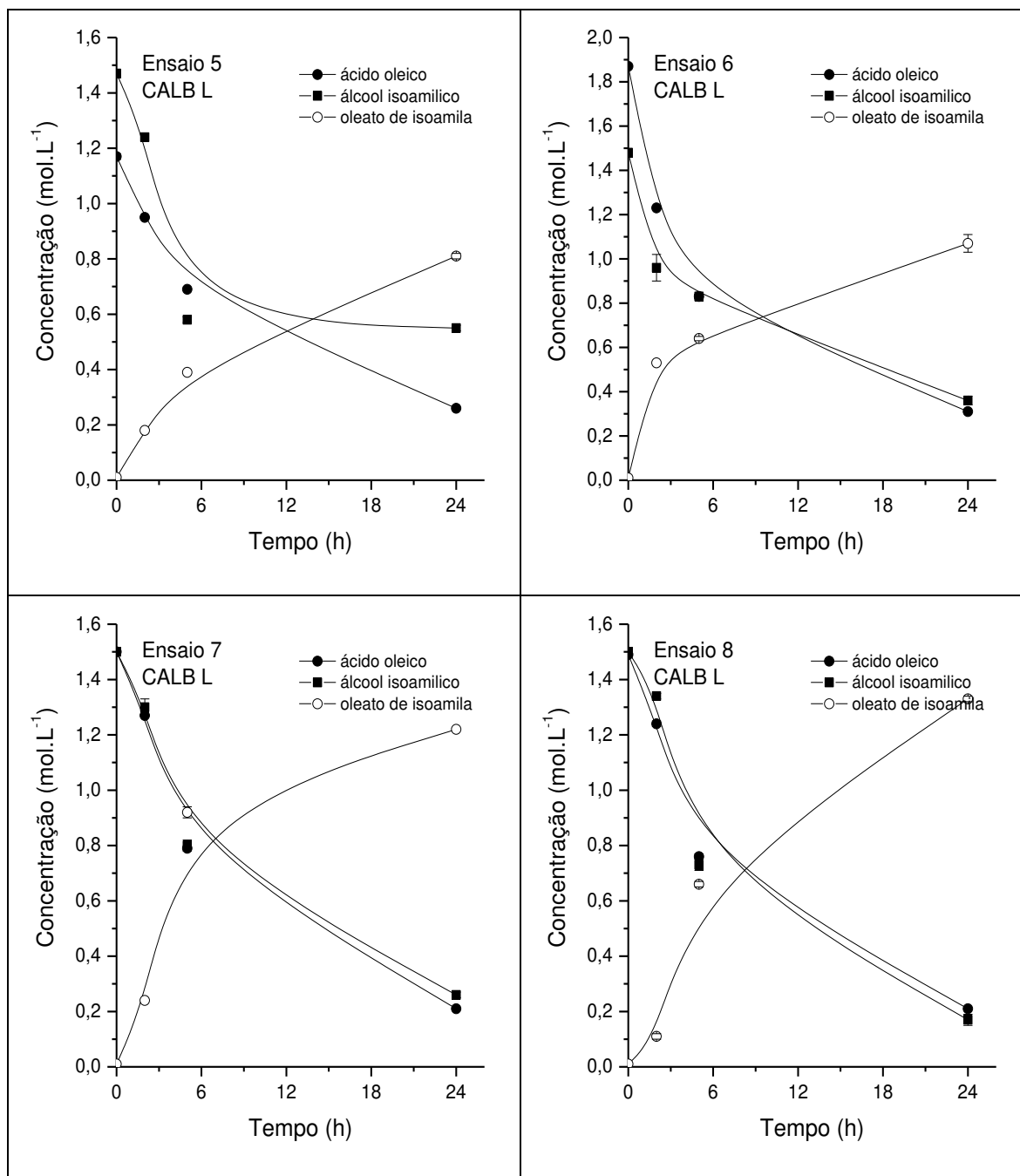
Meio com solvente: iso-octano; Agitação = 150 rpm, Volume do meio reacional = 20 mL

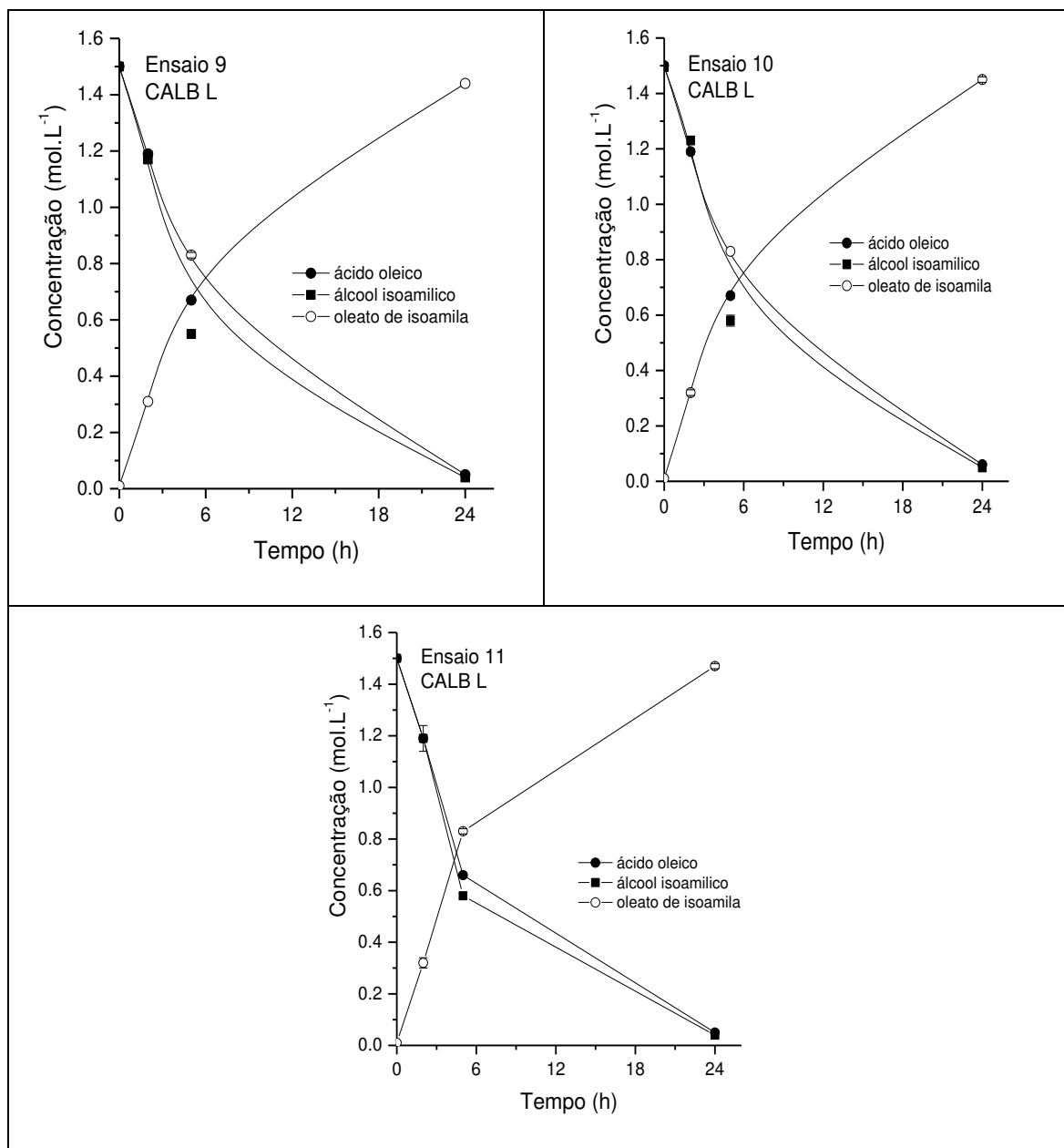
Razão molar Ácido : álcool	Concentração ácido oleico (mol.L ⁻¹)	Concentração álcool isoamílico (mol.L ⁻¹)	Teor de água (%)
0,75:1	1,17	1,47	0,071
1:1	1,50	1,50	0,070
1,25:1	1,87	1,48	0,066

Matriz experimental e resultados obtidos (24h) no planejamento fatorial 2² com face centrada na síntese do oleato de isoamila catalisada pela lipase *Candida antarctica* (CALB L)

Ensaio	Variável Independente		Variável resposta		
	Razão Molar Ácido: Álcool	Temperatura (°C)	Conversão molar (%)		Oleato de isoamila (mol.L ⁻¹)
			Ácido Oleico	Álcool Isoamílico	
1	0,75:1 (-1)	40 (-1)	94,9 ± 0,00	74,9 ± 0,21	1,00 ± 0,00
2	1,25: 1 (1)	40 (-1)	79,1 ± 1,48	97,3 ± 0,99	1,16 ± 0,00
3	0,75: 1 (-1)	50 (1)	50,5 ± 1,20	44,5 ± 0,28	0,55 ± 0,01
4	1,25: 1 (1)	50 (1)	84,6 ± 0,21	96,6 ± 0,99	1,39 ± 0,01
5	0,75: 1 (-1)	45 (0)	77,8 ± 0,28	62,6 ± 0,57	0,81 ± 0,01
6	1,25: 1 (1)	45 (0)	83,4 ± 0,00	76,0 ± 1,41	1,07 ± 0,04
7	1:1 (0)	40 (-1)	86,0 ± 0,07	82,7 ± 0,92	1,22 ± 0,00
8	1:1 (0)	50 (1)	85,9 ± 0,00	89,0 ± 1,48	1,33 ± 0,01
9	1:1 (0)	45(0)	96,7 ± 0,07	98,0 ± 0,00	1,44 ± 0,00
10	1:1(0)	45(0)	96,0 ± 0,00	97,0 ± 0,42	1,45 ± 0,01
11	1:1(0)	45(0)	96,7 ± 0,00	97,7 ± 0,49	1,47 ± 0,01







Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE H

Esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do estearato de isoamila em reator de leito fixo (regime contínuo)

Condições reacionais

Meio de alimentação: Óleo Fúsel e Ácido Esteárico (Razão molar 1:1)

Solvente: iso-octano

Teor de água no meio reacional = 0,3028%

Enzima = 3,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 3.391 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 5,0%

Temperatura = 45 °C

Densidade da enzima 0,7 g.mL⁻¹;

Volume de enzima=4,28 mL

Vazão = 0,0133 mL.min⁻¹ (0,80 mL.h⁻¹),

Volume útil do reator 10,0-4,28=5,72 mL;

Tempo espacial = 7,2 horas.

Tempo (h)	Concentração						Formação de Éster		Conversão molar (%)		Produtividade mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹	H ₂ O (%)
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			Estearato de Isoamila		Ácido	Álcool		
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹				
0	411,4	1,45	-	135,0	1,53	-	3,2	0,01	0	0	0	0,4528
1	188,1	0,66	0,79	72,6	0,82	0,71	273,9	0,77	54,5	46,4	1848	0,4428
2	154,6	0,54	0,91	56,1	0,64	0,89	321,3	0,91	62,8	58,2	2184	0,4461
3	126,6	0,45	1,00	50,0	0,57	0,96	350,0	0,99	69,0	62,7	2376	0,4575
4	95,9	0,34	1,11	35,4	0,40	1,13	388,9	1,10	76,6	73,9	2640	0,4587
5	84,4	0,30	1,15	30,1	0,34	1,19	408,5	1,15	79,3	77,8	2760	0,4518
6	75,0	0,26	1,19	29,7	0,34	1,19	420,8	1,19	82,1	77,8	2856	0,4487
7	67,9	0,24	1,21	30,3	0,34	1,19	423,5	1,20	83,5	77,8	2880	0,3820
8	61,8	0,22	1,23	25,3	0,29	1,24	434,3	1,23	84,8	81,1	2952	0,3086
9	66,95	0,24	1,21	30,1	0,34	1,19	430,0	1,21	83,5	77,8	2904	0,3328
10	65,3	0,23	1,22	28,1	0,32	1,21	433,5	1,22	84,1	84,1	2928	0,3541
11	59,8	0,21	1,24	25,2	0,29	1,24	439,2	1,24	85,5	85,5	2976	0,3008
12	58,2	0,20	1,25	24,6	0,28	1,25	442,8	1,25	86,2	86,2	3000	0,2502
22	47,8	0,16	1,29	21,6	0,25	1,28	459,0	1,29	89,0	83,7	3096	0,1239
23	41,2	0,14	1,31	22,3	0,25	1,28	462,8	1,31	90,3	83,7	3144	0,1205
24	39,6	0,14	1,31	23,0	0,26	1,27	464,6	1,31	90,3	83,0	3144	0,1197
26	40,1	0,14	1,31	22,3	0,25	1,28	465,0	1,31	90,3	83,7	3144	0,0870
27	38,5	0,14	1,31	21,9	0,25	1,28	464,8	1,31	90,3	83,7	3144	0,0869
28	40,2	0,14	1,31	22,8	0,25	1,28	466,6	1,31	90,3	83,7	3144	0,0891
33	44,9	0,15	1,30	22,1	0,25	1,28	464,6	1,31	89,7	83,7	3144	0,0854
47	41,2	0,14	1,31	12,7	0,14	1,39	463,3	1,31	90,3	90,9	3144	0,0832
48	41,9	0,15	1,30	12,6	0,14	1,39	462,0	1,31	89,7	90,9	3144	0,0815
72	40,3	0,14	1,31	12,5	0,14	1,39	462,2	1,31	90,3	90,9	3144	0,0810
84	110,6	0,39	1,06	39,2	0,44	1,09	361,2	1,02	73,1	71,2	2448	0,1731
96	174,0	0,62	0,83	88,2	0,65	0,88	287,0	0,81	57,2	52,9	1944	0,2260

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE I

Esterificação do óleo fúsel com ácido esteárico catalisada pela lipase *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do estearato de isoamila Regime Contínuo

Condições reacionais

Meio de alimentação: Óleo Fúsel e Ácido Esteárico (Razão molar 1:1)

Solvente: iso-octano

Teor de água no meio reacional = 0,3028%

Enzima = 3,0 g

Atividade hidrolítica da enzima = 266,2 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 8,1%

Temperatura = 45 °C

Densidade da enzima 0,7 g.mL⁻¹;

Volume de enzima=4,28 mL

Vazão = 0,017 mL.min⁻¹ (1,00 mL.h⁻¹),

Volume útil do reator 10,0-4,28=5,72 mL;

Tempo espacial = 5,6 horas.

Tempo (h)	Concentração						Formação do Estearato de Isoamila		Conversão Ácido (%)	Conversão Álcool (%)	Produtividade mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹	H ₂ O (%)
	Ácido Esteárico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹				
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**						
0		1,44	-		1,47	-		0,01	0	0	0	0,2531
1	185,7	0,65	0,79	59,4	0,67	0,80	280,5	0,79	54,9	54,4	1475	0,1020
2	155,3	0,55	0,89	51,0	0,58	0,89	315,0	0,89	61,8	60,5	1661	0,0821
3	124,6	0,44	1,00	40,2	0,46	1,01	353,8	1,00	69,4	68,7	1867	0,0818
4	101,1	0,36	1,08	37,5	0,42	1,05	367,5	1,04	75,0	71,4	1941	0,0783
5	87,5	0,31	1,13	30,0	0,34	1,13	402,0	1,14	78,5	76,9	2128	0,0680
6	70,6	0,25	1,19	30,0	0,34	1,13	420,0	1,19	82,6	76,9	2221	0,0650
7	72,6	0,26	1,18	24,8	0,28	1,19	416,6	1,18	81,9	81,0	2203	0,0628
8	72,4	0,25	1,19	24,8	0,28	1,19	416,6	1,18	82,6	81,0	2203	0,0649
10	69,0	0,24	1,20	25,8	0,29	1,18	430,0	1,21	83,3	80,3	2259	0,0695
12	55,6	0,20	1,24	20,1	0,23	1,24	439,2	1,24	86,1	84,4	2315	0,0750
22	39,2	0,14	1,30	14,4	0,16	1,31	463,5	1,31	90,3	89,1	2445	0,0827
24	33,0	0,11	1,33	9,3	0,10	1,37	477,3	1,35	92,4	93,2	2520	0,0872
48	31,0	0,11	1,33	8,9	0,10	1,37	479,3	1,35	92,4	93,2	2520	0,1021
72	30,1	0,11	1,33	8,9	0,10	1,37	478,4	1,35	92,4	93,2	2520	0,0950
95	32,7	0,11	1,33	8,9	0,10	1,37	477,9	1,35	92,4	93,2	2520	0,0974
96	31,4	0,11	1,33	8,5	0,10	1,37	478,3	1,35	92,4	93,2	2520	0,0930
119	30,2	0,11	1,33	8,6	0,10	1,37	473,1	1,34	92,4	93,2	2501	0,0980
120	30,9	0,11	1,33	8,3	0,09	1,38	480,2	1,36	92,4	93,9	2539	0,0977
143	32,8	0,11	1,33	8,8	0,10	1,37	482,2	1,36	92,4	93,2	2539	0,0991
144	31,4	0,11	1,33	8,3	0,09	1,38	480,9	1,36	92,4	93,9	2539	0,0988
168	30,1	0,11	1,33	6,6	0,08	1,39	481,8	1,36	92,4	94,6	2539	0,0965
192	30,0	0,10	1,34	7,6	0,09	1,38	483,0	1,36	93,1	93,9	2539	0,0978
216	29,8	0,10	1,34	9,1	0,10	1,37	482,3	1,36	93,1	93,2	2539	0,1120
240	29,3	0,10	1,34	8,0	0,09	1,38	480,0	1,36	93,1	93,9	2539	0,1090
264	28,0	0,10	1,34	7,2	0,08	1,39	482,4	1,36	93,1	94,6	2539	0,1088
276	60,7	0,21	1,23	48,0	0,54	0,93	336,0	0,95	85,4	63,3	2280	0,2540
288	133,8	0,47	0,97	64,0	0,73	0,74	240,0	0,68	67,4	50,3	1632	0,3210
312	300,8	1,06	0,38	100,5	1,14	0,33	110,0	0,31	26,4	22,4	744	0,5831

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE J

Esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do oleato de isoamila em reator de leito fixo (regime contínuo)

Condições reacionais

Meio de alimentação: Óleo Fúsel e Ácido oleico (Razão molar 1:1)

Solvente: iso-octano

Teor de água no meio reacional = 0,1660%

Enzima = 3,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 3.279,5 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 4,4 0%

Temperatura = 45 °C

Densidade da enzima 0,7 g.mL⁻¹;

Volume de enzima=4,28 mL

Vazão = 0,0133 mL.min⁻¹ (0,80 mL.h⁻¹),

Volume útil do reator 10,0-4,28=5,72 mL;

Tempo espacial = 7,2 horas.

Tempo (h)	Concentração						Formação de Éster		Conversão Ácido (%)	Conversão Álcool (%)	Produtividade mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹	Umidade (%)
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			Oleato de Isoamila					
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹				
0	426,4	1,50	-	129,5	1,47	-	0,36	0,01	0	0	0	0,1660
1	139,4	0,49	1,01	44,8	0,51	0,96	347,2	0,98	67,3	65,3	2385	0,0870
2	119,1	0,42	1,08	39,6	0,45	1,02	378,2	1,07	72,0	69,4	2604	0,0899
3	100,0	0,35	1,15	34,2	0,38	1,09	396,2	1,12	76,7	74,1	2725	0,1085
4	94,3	0,33	1,17	31,9	0,36	1,11	401,8	1,14	78,0	75,5	2774	0,0906
5	111,3	0,39	1,11	39,0	0,44	1,03	370,5	1,05	74,0	70,1	2555	0,0873
6	108,8	0,39	1,11	35,0	0,40	1,07	385,0	1,09	74,0	72,8	2652	0,1356
7	158,3	0,56	0,94	54,0	0,61	0,86	324,0	0,92	62,7	58,5	2239	0,1229
8	198,4	0,70	0,80	63,8	0,72	0,75	279,4	0,79	53,3	51,0	1922	0,1347
9	227,3	0,81	0,69	59,4	0,67	0,80	242,0	0,68	46,0	46,3	1655	0,1598
24	397,3	1,41	0,09	127,1	1,44	0,03	21,8	0,06	6,00	2,00	146	0,1821
27	399,1	1,41	0,09	126,1	1,43	0,04	24,7	0,07	6,00	2,00	170	0,1888
30	491,8	1,74	-	138,7	1,57	-	30,7	0,09	-	-	219	0,1994

Fonte: próprio autor.

APÊNDICE L

Esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB para mediar a síntese do oleato de isoamila em reator de leito fixo (regime contínuo)

Condições reacionais

Meio de alimentação: Óleo Fúsel e Ácido oleico (Razão molar 1:1)

Solvente: iso-octano

Teor de água no meio reacional = 0,1471%

Enzima = 3,0 g; Atividade hidrolítica da enzima = 266,2 U.g⁻¹;

Umidade da enzima imobilizada = 9,50%

Temperatura = 45 °C

Densidade da enzima 0,7 g.mL⁻¹;

Volume de enzima=4,28 mL

Vazão = 0,014 mL.min⁻¹ (0,84 mL.h⁻¹),

Volume útil do reator 10,0-4,28=5,72 mL;

Tempo espacial = 6,8 horas.

Tempo (h)	Concentração						Formação do Oleato de Isoamila		Conversão Ácido (%)	Conversão Álcool (%)	Produtividade mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹	Umidade (%)
	Ácido Oleico			Álcool Isoamílico			g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹				
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	C**						
0	410,5	1,45	-	128,1	1,45	-	4,5	0,01	0	0	0	0,1471
1	89,2	0,32	1,13	28,9	0,33	1,12	400,4	1,13	77,9	77,2	2561	0,1014
2	72,0	0,25	1,20	22,3	0,25	1,20	425,7	1,20	82,8	82,8	2720	0,0976
3	61,4	0,22	1,23	19,4	0,21	1,24	434,4	1,23	84,8	85,5	2788	0,0912
4	60,2	0,21	1,24	17,3	0,20	1,25	439,3	1,24	85,5	86,2	2811	0,0873
5	65,7	0,23	1,22	19,1	0,22	1,23	431,2	1,22	84,1	84,8	2765	0,1014
6	58,9	0,21	1,24	18,6	0,21	1,24	439,9	1,24	85,5	85,5	2811	0,1315
7	63,6	0,23	1,22	20,8	0,24	1,21	431,6	1,22	84,8	83,4	2765	0,1335
8	60,7	0,21	1,24	17,4	0,20	1,25	444,0	1,25	85,5	86,2	2833	0,1348
9	67,5	0,23	1,22	21,4	0,24	1,21	433,1	1,22	84,8	83,4	2765	0,1380
23	114,9	0,40	1,05	39,0	0,44	1,01	372,0	1,05	72,4	69,7	2380	0,3125
24	153,9	0,54	0,91	47,5	0,54	0,91	321,1	0,91	62,8	69,7	2063	0,2799
27	189,5	0,67	0,78	62,7	0,71	0,74	273,6	0,77	53,8	51,0	1745	0,2511
30	203,5	0,72	0,73	61,5	0,70	0,75	258,3	0,73	50,3	51,7	1655	0,2549

Fonte: Próprio autor.